

LIGIA CRISTINA KALB

**CLATRINA EM *Trypanosoma cruzi*: IDENTIFICAÇÃO DO GENE E
LOCALIZAÇÃO CELULAR**

**CURITIBA
2011**

LIGIA CRISTINA KALB

**CLATRINA EM *Trypanosoma cruzi*: IDENTIFICAÇÃO DO GENE E
LOCALIZAÇÃO CELULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Maurílio José Soares.

**CURITIBA
2011**

Aos melhores pais do mundo! Por me fazerem ver o valor da vida,
das pequenas coisas, pelo incentivo, dedicação, pelo colinho! E
pela melhor herança que poderiam ter deixado: os estudos!

Ao amor da minha vida: Adelicio, por me fazer a mulher mais feliz
do mundo! Pela presença, por compartilhar os mesmos sonhos,
pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurílio José Soares pela orientação, paciência e confiança. Pelo exemplo de pesquisador, mas mais que isso pelo exemplo de simplicidade, bom caráter, amizade e respeito. Fica aqui minha eterna admiração e meu mais sincero agradecimento.

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso pela disposição em sempre tirar dúvidas, fazer protocolos e no final corrigir esta dissertação.

À Rosana Elisa Gonçalves Gonçalves Pinho por estar sempre disposta a sugerir experimentos e ajudar a pôr em prática, pela agradável convivência, pelo exemplo de disciplina e pelo apoio em todo este trabalho.

Aos amigos de laboratório Claudia Maria do Nascimento Moreira, Carla Vanessa de Paula Lima, Josiane Cardoso, Daniela Fiori, Flávia Oliveira, Camila Azeredo, e a todos os amigos do Instituto Carlos Chagas pela amizade, pelos risos, por aquela mãozinha, pelas conversas sérias ou não.

Aos amigos Nilson José Fidêncio, Vanessa e Tania pela amizade e apoio técnico.

À minha irmã Ana pela agradável companhia, pela ajuda nas pesquisas de flores, tecidos, convites e amastigotas.

À minha família por me passarem a certeza de que sempre poderei contar com eles.

Aos meninos Cassiano e Guilherme, e à Flavia pela companhia, pelas risadas, pelo bom humor!

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Porque para DEUS nada é impossível.
Lucas 1:37

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. ENDOCITOSE.....	1
1.1.1 Endocitose mediada por clatrina.....	2
1.1.2 Breve histórico da clatrina.....	3
1.1.3 Estrutura molecular da clatrina.....	6
1.1.4 Cadeia leve de clatrina.....	7
1.1.5 Proteínas adaptadoras.....	8
1.1.6 Proteínas responsáveis pelo brotamento da vesícula de clatrina.....	10
1.2. OS PROTOZOÁRIOS TRIPANOSOMATÍDEOS.....	11
1.2.1 O ciclo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.2.2 Biologia Celular de <i>T. cruzi</i>	12
1.2.3 Endocitose em protozoários.....	15
1.2.4 Endocitose em <i>T. cruzi</i>	16
1.2.5 Clatrina em tripanosomatídeos.....	17
2 OBJETIVO GERAL.....	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS.....	22
3.1.1 Reagentes.....	22
3.1.2 Meios de cultura.....	23
3.1.3 Tampões e Soluções.....	23
3.1.4 Organismos.....	24
3.2 CULTIVO DE PARASITAS.....	25
3.2.1 Epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.2.2 Tripomastigotas metacíclicos e formas em diferenciação de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25

3.2.3 Amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.2.4 Outros Tripanosomatídeos.....	26
3.2.5 Obtenção de extrato proteico de tripanosomatídeos.....	26
3.3 SELEÇÃO DE GENES.....	27
3.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES.....	27
3.5 LIGAÇÃO DOS GENES NOS VETORES DE EXPRESSÃO.....	29
3.6 TRANSFORMAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES.....	30
3.7 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES ATRAVÉS DA TÉCNICA DA PALITAGEM (TOOTH PICK).....	30
3.8 PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PRODUTOS DE PCR.....	30
3.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	31
3.10 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO.....	31
3.11 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	32
3.12 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.....	32
3.13 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	33
3.14 COMPLEXAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL.....	34
3.15 COLOCALIZAÇÃO DE MARCADORES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	34
3.16 MUTAGÊNESE CONDICIONADA.....	34
3.16.1 Amplificação do gene da TcCla ^{K184A}	35
3.16.2 Clonagem do gene da TcCla ^{K184A} em vetor de entrada pDNOR-221 do Sistema Gateway.....	36
3.16.3 Recombinação LR do gene da TcCla ^{K184A} em vetor de destino pTcDD do sistema Gateway.....	37
3.16.4 Transfecção do vetor em <i>T. cruzi</i>	38
3.16.5 Indução da estabilidade de expressão da TcCLA ^{K184A}	38

3.16.6 Coloração dos parasitas transfectantes.....	39
3.17 IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	39
4 RESULTADOS	41
4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PARA CLATRINA E SUBUNIDADES DO COMPLEXO ADAPTADOR AP2 EM <i>T. cruzi</i>	41
4.2 OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	41
4.3 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	44
4.4 LOCALIZAÇÃO CELULAR.....	47
4.5 DOMINANTE NEGATIVO.....	55
4.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	58
5 DISCUSSÃO	59
5.2 ANÁLISE GÊNICA.....	59
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	63
5.4 ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO SUB-CELULAR.....	65
6 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 –	Vias de endocitose.....	2
FIGURA 1.2 –	Endocitose mediada por clatrina.....	5
FIGURA 1.3 –	A arquitetura de clatrina.....	6
FIGURA 1.4 –	Representação esquemática de proteínas adaptadoras.....	9
FIGURA 1.5 –	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
FIGURA 1.6 –	Esquema das principais estruturas celulares de <i>T. cruzi</i>	14
FIGURA 1.7 –	Modelo hipotético para endocitose em <i>T. cruzi</i>	20
FIGURA 3.1 –	Esquema do plasmídeo pGEX-4T-1.....	28
FIGURA 3.2 –	Domínios da cadeia pesada de clatrina de <i>T. cruzi</i>	35
FIGURA 3.3 –	Esquema de amplificação de TcCla ^{K184A} em duas fases.....	36
FIGURA 3.4 –	Vetor de entrada utilizado, pDONR 221(Invitrogen TM).....	36
FIGURA 3.5 –	Esquema simplificado do vetor de destino pTcDD-Clatrina.	38
FIGURA 4.1 –	Amplificação dos genes de <i>T. cruzi</i>	42
FIGURA 4.2 –	Clonagem dos genes no vetor pGEX-4T1.....	43
FIGURA 4.3 –	Expressão das proteínas recombinantes insolúveis confirmadas por <i>Western blot</i> anti-GST.....	43
FIGURA 4.4 –	Expressão e purificação de TcClatrina	50
FIGURA 4.5 –	Análise da produção de anticorpos para a subunidade AP β	45
FIGURA 4.6 –	Análise por <i>Western blot</i> da expressão da cadeia pesada de clatrina de <i>T. cruzi</i> (TcClatrina) durante o processo de metaciclogênese	45
FIGURA 4.7 –	Análise da expressão da TcClatrina em diferentes tripanosomatídeos por meio de <i>Western blot</i>	46
FIGURA 4.8 –	Análise da expressão da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes tripanosomatídeos por meio de <i>Western blot</i>	47
FIGURA 4.9 –	Localização da cadeia pesada de clatrina (TcClatrina) em diferentes formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> por microscopia confocal a laser.....	48
FIGURA 4.10 –	Localização da TcClatrina em diferentes tripanosomatídeos por microscopia confocal a laser.....	49

FIGURA 4.11 –	Localização da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> por microscopia confocal a laser.....	50
FIGURA 4.12 –	Localização da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes tripanosomatídeos por microscopia confocal a laser.....	51
FIGURA 4.13 –	Localização da Tc-AP β em <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> por microscopia confocal a laser.....	52
FIGURA 4.14 –	Imunolocalização da cadeia pesada da clatrina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por microscopia eletrônica de transmissão.....	54
FIGURA 4.15 –	Imunolocalização da cadeia leve da clatrina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por microscopia eletrônica de transmissão.....	55
FIGURA 4.16 –	Amplificação por PCR do gene TcCla ^{K184A} em duas fases...	56
FIGURA 4.17 –	A) <i>Western blot</i> para verificar a presença da TcCla ^{K184A} fusionada ao domínio-DD (genótipo TcClatrina dominante negativo). B) Visualização de forma epimastigota contendo o gene TcCla ^{K184A} após 24 horas de indução com rapamicina , mediante coloração com Panótico Rápido.....	57
FIGURA 4.18 –	Imunoprecipitação das proteínas AP β e da proteína para cadeia leve de clatrina com a cadeia pesada de clatrina.....	58
FIGURA 5.1 –	Domínios estruturais da cadeia pesada de clatrina de <i>T. cruzi</i> (TcClatrina).....	60
FIGURA 5.2 –	Localização de resíduos de cisteínas no domínio de trimerização da cadeia pesada de clatrina.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	GENES DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> SELECIONADOS.....	27
TABELA 2 –	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	29
TABELA 3 –	INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE TcCla ^{K184A}	35
TABELA 5 –	PERCENTAGEM DE IDENTIDADE E SIMILARIDADE (ENTRE PARÊNTESIS) DE GENES DE T. CRUZI COMPARADOS COM OS PRESENTES EM OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS E EM HUMANOS.....	41

RESUMO

Entender a via endocítica de protozoários parasitas da família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea) é fundamental, pois esta via desempenha um importante papel no direcionamento intracelular de nutrientes e de agentes terapêuticos. Esta dissertação teve por objetivo avaliar a participação da clatrina nos eventos iniciais de endocitose em *Trypanosoma cruzi*, bem como sua localização sub-celular. Assim, identificamos no genoma de *T. cruzi* os genes que codificam a cadeia pesada de clatrina (Tc00.1047053506167.50 - TcClatrina), a cadeia leve de clatrina (Tc00.1047053506211.240 - TcCLC), e para a subunidade do complexo adaptador AP (Tc00.1047053506247.200 - AP β). Foram produzidos anticorpos policlonais em camundongo para cada uma dessas quatro proteínas. Análise por Western blot demonstrou que os antisoros para TcClatrina e AP β reagiram com polipeptídeos de peso molecular previsto em diferentes tripanosomatídeos. Usando o anticorpo para TcClatrina observamos por microscopia confocal a localização desta proteína na bolsa flagelar de formas epimastigotas e na região compatível com o Complexo de Golgi de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Além disso, também houve reação positiva difusa pelo citoplasma das células, o que corresponderia às moléculas de clatrina não polimerizadas. Os dados indicam que na bolsa flagelar de *T. cruzi* ocorre endocitose mediada por clatrina. Marcação da TcClatrina foi positiva também na região da bolsa flagelar de *Crithidia deanei*, *C. fasciculata* e *Phytomonas serpens*, demonstrando assim que esta proteína é bem conservada nos tripanosomatídeos e que a endocitose de nutrientes nestes parasitas parece ocorrer na bolsa flagelar mediada por clatrina. Também obtivemos reação positiva para a cadeia leve de clatrina por microscopia confocal em diferentes tripanosomatídeos (*C. deanei*, *C. fasciculata*, *Blastocrithidia culicis* e *P. serpens*), possivelmente associada ao Complexo de Golgi. Por microscopia eletrônica de transmissão (MET) localizamos esta proteína associada à membrana da bolsa flagelar de epimastigotas de *T. cruzi*, indicando uma associação com a cadeia pesada da clatrina, como esperado. Nossos dados por Western blot demonstraram a expressão de clatrina (cadeia leve e pesada) e da subunidade do complexo adaptador AP em *T. cruzi* e em outros tripanosomatídeos. Dados de imunoprecipitação mostraram que a cadeia leve de clatrina e a subunidade AP β do complexo adaptador AP interagem com a cadeia pesada de clatrina, como esperado.

ABSTRACT

Understanding the endocytic pathway of protozoan parasites of the family Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea) is fundamental, because this pathway plays an important role in intracellular targeting of nutrients and therapeutic agents. Aim of this dissertation was to evaluate the involvement of clathrin in the initial events of endocytosis in *Trypanosoma cruzi*, as well as its sub-cellular location. Thus, we have identified in the genome of *T. cruzi* genes encoding the clathrin heavy chain (Tc00.1047053506167.50 - TcClatrina), hypothetical clathrin light chain (Tc00.1047053506211.240 - TcCLC) and an subunit of the adapter complex AP (Tc00.1047053506247.200 - AP β). Polyclonal antibodies were produced in mice against each of these four proteins. Western blot analysis showed that the antisera for TcClatrina and AP β reacted with polypeptides of expected molecular weight in different trypanosomatids. Using the antibody against TcClatrina we have observed by confocal microscopy the localization of this protein in the flagellar pocket of epimastigotes and in the region compatible with the Golgi complex of trypomastigotes of *T. cruzi*. Moreover, there was also diffuse positive reaction throughout the cell cytoplasm, which corresponds to molecules of non-polymerized clathrin. Our data indicate that clathrin-mediated endocytosis occurs at the flagellar pocket of *T. cruzi*. Tagging TcClatrina was also positive in the flagellar pocket region of *Crithidia deanei*, *C. fasciculata* and *Phytomonas serpens*, which demonstrate that this protein is well conserved in trypanosomatids and that clathrin-mediated endocytosis of nutrients in these parasites occurs at the flagellar pocket membrane. We also obtained positive reaction for the clathrin light chain by confocal microscopy in different trypanosomatids (*Blastocrithidia culicis*, *C. deanei*, *C. fasciculata* and *P. serpens*), possibly associated with the Golgi Complex. By transmission electron microscopy (TEM) we could localize this protein associated with the flagellar pocket membrane of *T. cruzi* epimastigotes, indicating an association with the clathrin heavy chain, as expected. Our Western blot data demonstrated the expression of clathrin (heavy and light chain) and an subunit of the AP adapter complex in *T. cruzi* and other trypanosomatids. Immunoprecipitation data showed that the clathrin light chain and the AP β subunit of the adapter complex AP interact with the clathrin heavy chain, as expected.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENDOCITOSE

Uma característica das células eucarióticas é a presença de um elaborado sistema de endomembranas, responsável pelo intercâmbio de macromoléculas com o meio ambiente. Neste sistema, a **via secretória** envia enzimas, proteínas, glicoconjugados e lipídios recém-sintetizados para os lisossomos ou para exterior da célula, enquanto a **via endocítica** importa macromoléculas e partículas extracelulares para o interior da célula. O transporte da carga secretória ou endocítica ao longo destas vias ocorre por transferência entre diferentes organelas limitadas por membrana. Apesar desta transferência, cada organela mantém seu conjunto característico de macromoléculas residentes (Bonifacino e Lippincott-Schwartz, 2003).

De acordo com Roth (2006), o conceito de **endocitose** já era conhecido desde o final do século XIX. Em 1883 Metchnikoff descreveu e definiu a fagocitose observando que leucócitos humanos eram capazes de ingerir bactérias e destruí-las através de digestão celular. Já o termo “pinocitose” (beber da célula) foi primeiramente introduzido por Lewis em 1931, que demonstrou macrófagos e outras células ingerindo fluidos extracelulares em pequenas vesículas.

Até recentemente, os modelos que descreviam as vias endocíticas eram relativamente simples: as principais vias levavam à degradação no lisossomo ou à reciclagem de volta à membrana plasmática, enquanto em células epiteliais polarizadas ocorria o transporte através da célula (transcitose). Hoje se compreende que as vias de tráfego endocítico são mais complexas e multifuncionais, com a existência de vias interligadas que podem transportar moléculas para diferentes destinos dentro da célula (Maxfield e McGraw, 2004). A abundância de vias e compartimentos endocíticos é um desafio na compreensão de como o sistema endocítico opera para regular o destino de várias vesículas transportadoras. Os principais mecanismos de entrada de moléculas ou partículas na célula por endocitose estão apresentados na Figura 1.1. Estas vias complexas têm também um papel importante no direcionamento intracelular de agentes terapêuticos e na determinação do destino intracelular de patógenos e toxinas (Maxfield e McGraw, 2004).

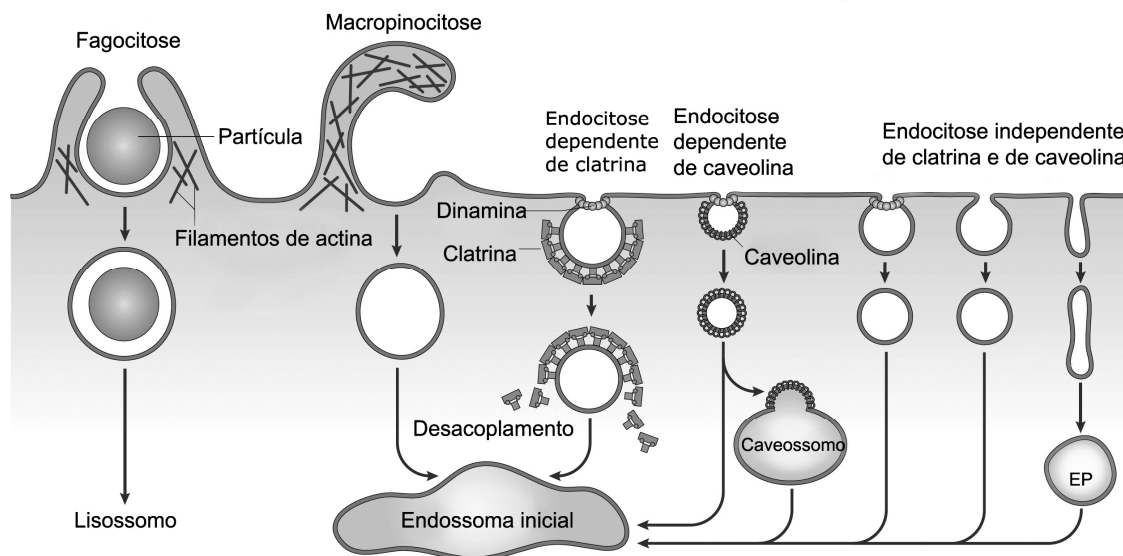


Figura 1.1. Vias de endocitose. Partículas maiores podem ser englobadas por fagocitose ou macropinocitose, enquanto que fluidos e moléculas podem ser ingeridos via diferentes tipos de vesículas endocíticas. Todos estes eventos são dependentes de actina, que atua no remodelamento da membrana plasmática e auxiliando na formação das vesículas. As vesículas endocíticas podem ser classificadas de acordo com a presença/ausência de componente protéico em seu revestimento, como endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina ou endocitose independente de clatrina e caveolina. EP (ou GEEC): endossomo inicial rico em proteínas ancoradas à membrana via GPI (Modificado de Mayor e Pagano, 2007).

1.1.1 Endocitose mediada por clatrina

O tipo mais freqüente, e provavelmente o melhor caracterizado, de endocitose envolve vesículas revestidas pela proteína clatrina, que atuam na internalização de receptores e seus ligantes. Muitos dos ligantes são posteriormente degradados em endossomos tardios ou lisossomos, enquanto muitos dos receptores são reciclados para a membrana plasmática e reutilizados até várias centenas de vezes (Maxfield e McGraw, 2004)

Na endocitose mediada por clatrina, o material entra na célula em vesículas formadas por invaginação e subsequente brotamento de porções da membrana plasmática. Vesículas revestidas de clatrina são encontradas em todas as células nucleadas, de leveduras a humanos (Conner e Schmid, 2003). Este tipo de endocitose tem um papel importante na internalização de lipídios, proteínas e macromoléculas, na reciclagem de vesículas sinápticas e na regulação de

receptores de superfície (Young, 2007). Além disto, vesículas revestidas com clatrina também estão envolvidas na via secretória, atuando no transporte de glicoconjugados a partir da rede trans-Golgi (TGN) ao endossomo tardio ou à membrana plasmática (Brodsky et al., 2001; Kirchhausen, 2000).

Muito do que se sabe sobre as propriedades bioquímicas e estruturais das vesículas revestidas de clatrina veio do estudo de material preparado a partir de cérebros de mamíferos. Assim, vale ressaltar que as propriedades destas preparações refletem provavelmente as vesículas que ocupam a membrana após a descarga do neurotransmissor na sinapse (Kirchhausen, 2000).

1.1.2 Breve histórico sobre a clatrina

Os aspectos básicos da formação de vesículas revestidas por clatrina datam de 1964, quando Thomas Roth e Keith Poter descreveram vesículas revestidas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), ao observar a endocitose de gema de ovo por oócitos do mosquito *Aedes aegypti*. Eles notaram a formação de vesículas contendo em seu interior a gema de ovo, sendo que a porção citoplasmática da membrana destas vesículas apresentava um revestimento que chamaram de “em cerdas” (bristles). Os autores especularam que esse revestimento teria a função de curvar a membrana, mas ainda sem ter o conhecimento de que proteína se tratava (Roth, 2006).

Na primeira descrição de endocitose mediada por receptor foi observado que partículas de LDL ligavam-se às células, eram agregadas em vesículas revestidas e então internalizadas (Goldstein et al., 1979). Assim, anos antes do receptor para LDL ser purificado, esse estudo sugeriu que receptores de superfície celular para LDL e outros ligantes poderiam ser proteínas transmembranares com um sítio citoplasmático para ligação de elementos de formação de revestimento de vesículas de endocitose (Roth, 2006).

O atual entendimento das bases moleculares da endocitose mediada por clatrina começou em 1969, quando Kanaseki e Kadota analisaram vesículas revestidas e perceberam que o revestimento formava uma gaiola regular com estrutura composta por pentágonos e hexágonos (Roth, 2006).

Alguns anos depois, Barbara Pearse (Pearse, 1976) purificou essas vesículas e mostrou que o revestimento era composto primariamente por uma proteína, à qual

chamou de clatrina por seu aspecto semelhante a uma grade (*clatratus*, em latim). Ela também determinou a estrutura com que a clatrina se polimeriza e forma um trímero, que ela chamou de “trisquélion”. Em 1986 Pearse, Vigers e Crowther mostraram que o trímero de clatrina não se liga diretamente à membrana plasmática, mas necessita de proteínas acessórias que se posicionem entre a clatrina e a membrana, chamadas hoje de proteínas adaptadoras (APs). Mas somente 30 anos após a clatrina ter sido descoberta é que sua estrutura tridimensional foi totalmente elucidada (Fotin et al., 2004).

Nos últimos anos a compreensão dos detalhes moleculares da endocitose mediada por clatrina tem aumentado enormemente. Muitas proteínas foram descobertas que funcionam como adaptadores carga-específicos que trazem os complexos receptores-ligantes para os sítios de membrana com revestimento (Figura 1.2). Entretanto, até o momento não se sabe o suficiente sobre como as vias endocíticas são reguladas, nem como as proteínas de membrana são enviadas na via endocítica aos muitos destinos diferentes na célula (Roth, 2006).

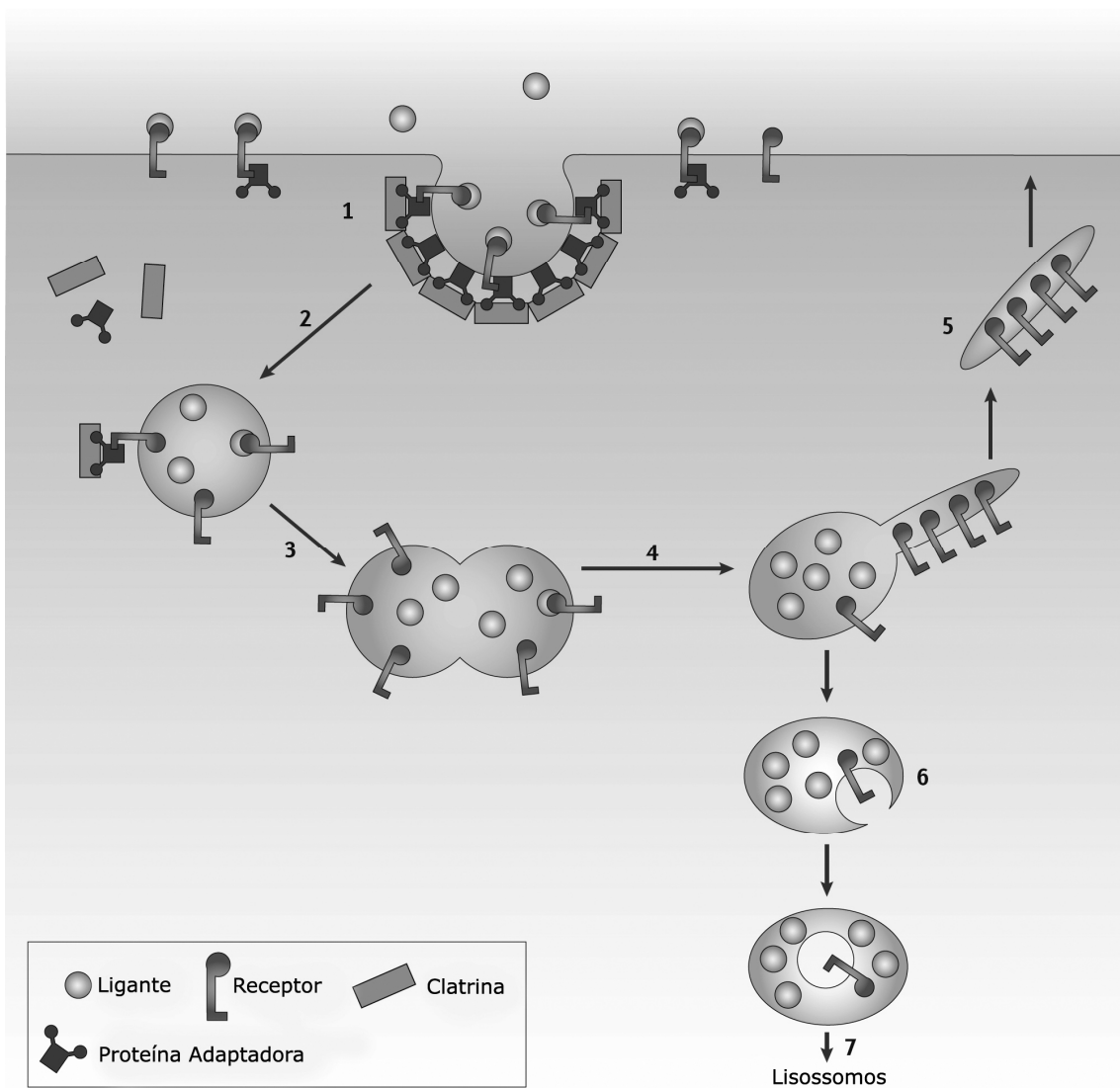


Figura 1.2. Endocitose mediada por clatrina. Ligantes extracelulares se acoplam a receptores na superfície celular e são concentrados em pequenos domínios da membrana, por associação a uma rede de proteínas adaptadoras (AP) que se ligam à porção citoplasmática do receptor. Essas APs por sua vez se ligam à clatrina, gerando a formação de uma vesícula revestida na membrana plasmática (1). Com o crescimento da vesícula, esta se desprende da membrana. Em seguida o revestimento de clatrina se desacopla (2) e a vesícula se funde (3) com outras vesículas previamente internalizadas para formar os endossomos iniciais. Nestes, alguns ligantes são liberados de seus receptores (4), e os receptores são então reciclados para a superfície celular (5). Alguns receptores podem permanecer no endossomo inicial, retidos em vacúolos (porções da membrana que invaginaram), criando assim um endossomo multivesicular (6). As vesículas endocíticas são então entregues aos lisossomos (7). Adaptado de Roth, 2006.

1.1.3 Estrutura molecular da clatrina

O revestimento de clatrina (Figura 1.3) é construído a partir de unidades formadas por 3 cadeias polipeptídicas pesadas (~192 kDa) e 3 leves (~25 kDa) que juntas formam uma estrutura de 3 pernas, que Pearse (1981) chamou de trisquélion (unidade de montagem da clatrina). Esses trisquéliões de clatrina se estruturam em uma rede convexa de hexágonos e pentágonos semelhante a um cesto, para formar um revestimento na superfície citosólica das membranas. Os revestimentos de clatrina podem apresentar diferentes formas e tamanhos, sendo a menor forma simétrica o barril hexagonal (Edeling et al., 2006).

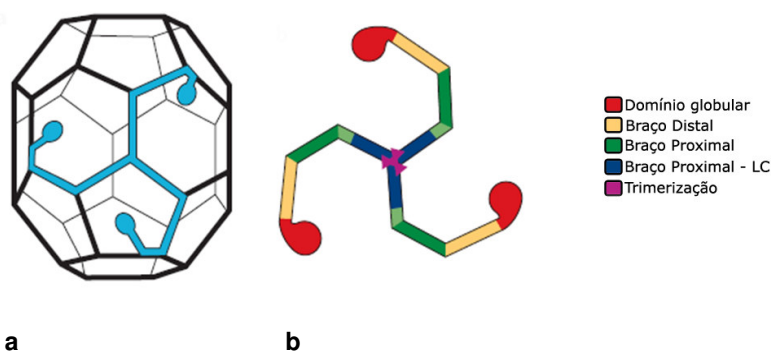


Figura 1.3. A arquitetura de clatrina. (a) Estrutura em forma de barril, mostrando em azul a unidade de formação da clatrina (trisquélion). (b) Arquitetura do trisquélion, formado por 3 cadeias pesadas de clatrina. As cadeias são mantidas juntas por um domínio de trimerização (em roxo), composto por cerca de 100 resíduos da região C-terminal de cada cadeia pesada. Em seguida há o braço proximal (em azul e verde, sendo que a porção em azul é a região de ligação à cadeia leve de clatrina) e o braço distal (em amarelo). Por fim ocorre o domínio globular (em vermelho), separado do braço distal por um linker flexível. Os domínios globulares se dispõem para dentro da gaiola, em direção à membrana. Os braços da cadeia pesada são compostos por sete domínios repetidos (CHCR – clatrin heavy chain repeat). A cadeia pesada de clatrina tem cerca de 450 Angstroms de comprimento (Adaptado de Edeling et al., 2006).

A molécula da cadeia pesada da clatrina pode ser dividida em três domínios: proximal, distal e globular (Kirchhausen e Harrison, 1984). O domínio proximal está localizado na porção C-terminal, próximo ao centro do trisquélion, e contém os domínios de ligação à cadeia leve e de trimerização. Entre o domínio proximal e o

distal há a formação de um “joelho”, e ligando o domínio distal ao globular encontramos um linker (vínculo) flexível.

Ybe e colaboradores (1999) identificou um motivo repetitivo na cadeia pesada de clatrina (CHCR). Em cada braço da cadeia pesada de clatrina são encontrados sete desses motivos, denominados CHCR1-7. Cada motivo CHCR é composto por 145 resíduos formando uma estrutura rígida em α -hélices antiparalelas, que se orientam perpendicularmente em cada braço da cadeia pesada, com um núcleo de interação hidrofóbica.

A sequência nucleotídica da cadeia pesada é altamente conservada entre as espécies e entre os tecidos de uma mesma espécie. A maioria das variações é proveniente de substituições conservadas, geralmente com menos de três resíduos de aminoácidos. A forte pressão para preservar a estrutura primária provavelmente reflete os contatos necessários para a montagem, bem como o grande número de interações com outras proteínas envolvidas na triagem da carga e na regulação da formação do revestimento (Kirchhausen, 2000).

Existem diversas proteínas que interagem com as vesículas revestidas por clatrina e com a membrana plasmática, auxiliando na regulação da via endocítica. As interações mais diretas ocorrem com proteínas adaptadoras (AP), como por exemplo, os complexos adaptadores. Estas proteínas conectam os segmentos citoplasmáticos de receptores ao revestimento de clatrina. Outras proteínas como auxilina, anifisina e epsina também conectam a clatrina a uma extensa e complexa rede de interações que controlam e modulam a formação do revestimento (Kirchhausen, 2000). Já foram descritas mais de 150 proteínas diferentes associadas a vesículas revestidas por clatrina (Blondeau et al., 2004).

1.1.4 Cadeia leve de clatrina

A sequência nucleotídica da cadeia leve de clatrina não é tão conservada entre as espécies quanto a da cadeia pesada. A maioria dos tecidos de mamíferos contém duas cadeias leves distintas, mas relacionadas (LCa e LCb). Leveduras expressam apenas uma cadeia leve. A massa molecular predita a partir de cDNA de todas as cadeias leves é de 23 a 26 kDa. A porção N-terminal da cadeia leve tende a ser rica em prolina e glicina, o que pode explicar a anômala motilidade

eletroforética dessas proteínas, que eleva a massa molecular estimada para 32-36 kDa (Kirchhausen, 2000).

Ybe e colaboradores (1999) propuseram que a montagem da clatrina no meio intracelular é controlada aparentemente pela ligação da cadeia leve de clatrina, que impede que o trisquélion seja montado espontaneamente e de forma não desejada no pH fisiológico.

1.1.5 Proteínas adaptadoras

A clatrina não se associa diretamente à membrana das vesículas endocíticas: ela é recrutada por proteínas intermediárias adaptadoras, as quais se ligam diretamente à cauda citoplasmática de receptores transmembranares específicos. Essa associação determina a inclusão seletiva de macromoléculas na vesícula e forma uma interface entre a clatrina na face interna da membrana e a carga incorporada na face extracelular da bicamada lipídica (Brodsky et al., 2001). Estas proteínas adaptadoras podem ser complexos heterotetraméricos (proteínas adaptadoras, AP) ou monoméricos (GGA, AP180/CALM) (Edeling et al., 2006).

As proteínas mais abundantes em uma vesícula revestida por clatrina (depois da clatrina), são os complexos adaptadores heterotetraméricos (AP). Os complexos AP desempenham diferentes papéis nos revestimentos, tais como o recrutamento de clatrina específico de cada organela, a seleção de proteínas transmembranares específicas para incorporação nas vesículas revestidas por clatrina, e a ligação dos fatores acessórios que regulam a montagem e desmontagem do revestimento, a formação de vesículas e a interação com o citoesqueleto (Bonifacino e Lippincott-Schwartz, 2003).

Foram identificados até agora quatro complexos multifuncionais de proteínas adaptadoras estruturalmente relacionadas (AP₁, AP₂, AP₃ e AP₄), que atuam no brotamento e formação de vesículas em diferentes localizações sub-celulares (Figura 1.4). O complexo AP₁ está relacionado ao tráfego a partir da Rede Trans-Golgi ao endossomo tardio, enquanto o complexo AP₂ está associado ao tráfego a partir da membrana plasmática ao endossomo tardio. O complexo AP₃ foi encontrado próximo aos endossomos (Dell'Angelica et al., 1997; Simpson et al., 1997), e o complexo AP₄ foi encontrado próximo à rede Trans-Golgi (Dell'Angelica et al., 1997).

Esse dois últimos complexos foram descritos, mas ainda faltam evidências de sua associação com a clatrina.

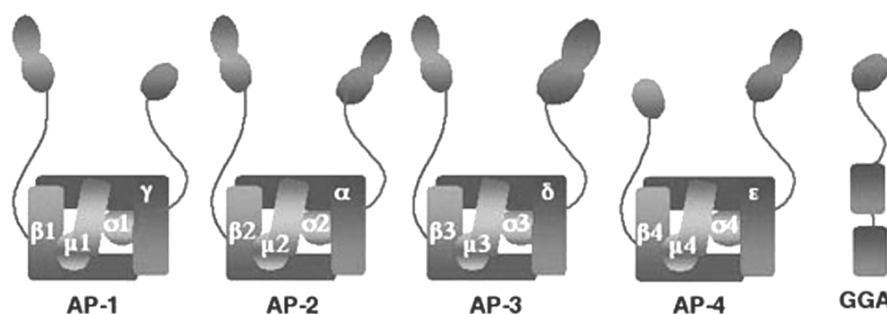


Figura 1.4. Representação esquemática de proteínas adaptadoras. Referência: <http://cbmp.nichd.nih.gov/sipt/index.html>

Presentes em vesículas revestidas em uma proporção de cerca de um por dois trisquélions, os complexos AP contêm duas grandes subunidades (~100 kDa) denominadas α e β , sendo que α é homóloga a γ , δ e ϵ nos complexos AP₁, AP₃ e AP₄ respectivamente. Além disto, os complexos AP contêm uma subunidade média (~50 kDa), denominada μ_{1-4} nos complexos AP₁₋₄, e uma subunidade pequena (~20 kDa), denominada σ_{1-4} nos complexos AP₁₋₄ (Edeling et al., 2006).

As subunidades (adaptinas) dos complexos adaptadores são estruturalmente relacionadas e provavelmente desempenham funções semelhantes. Por exemplo, as subunidades μ estão envolvidas no reconhecimento das caudas citoplasmáticas dos receptores através do sinal de tirosina (YppØ), enquanto subunidades β interagem com a cadeia pesada da clatrina (Kirchhausen, 2000). A subunidade α especifica o local de montagem da clatrina na membrana plasmática, enquanto que as subunidades divergentes γ , δ e ϵ (nos complexos AP₁, AP₃ e AP₄, respectivamente) orientam a montagem em outras organelas. A subunidade σ_2 parece ter um papel estrutural na estabilização do domínio central (Conner e Schmid, 2003).

Há ainda um outro tipo de proteína adaptadora monomérica, denominada GGA (Golgi localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding protein), que possui homologia com a subunidade γ do complexo adaptador AP1. As GGAs estão localizadas no Complexo de Golgi e estão envolvidas com transporte do Golgi para os lisosomos em leveduras. GGAs são proteínas monoméricas, mas

contém domínios que podem desempenhar todas as funções das proteínas do complexo adaptador heterotetramérico, incluindo o reconhecimento de carga e recrutamento da clatrina (Brodsky et al., 2001).

As proteínas adaptadoras são necessárias mas não suficientes para montagem do revestimento de clatrina das vesículas. De fato, diversas proteínas acessórias tem sido descritas na endocitose mediada por clatrina, que auxiliam e tem papel fundamental na regulação da via (Conner e Schmid, 2003).

1.1.6 Proteínas responsáveis pelo brotamento da vesícula de clatrina

No estágio final da formação da vesícula revestida por clatrina ocorre a associação da proteína dinamina à membrana plasmática, promovendo a liberação da vesícula. A dinamina é uma proteína com atividade GTPase. Mutações que inativam essa atividade resultam na formação completa da vesícula revestida por clatrina, mas esta não consegue se soltar da membrana, continuando presa por um fino pescoço (Conner e Schmid, 2003).

A dinamina contém segmentos que recrutam outras proteínas. Duas das proteínas recrutadas pela dinamina através de seu domínio SH3 rico em prolina são a anifisina e a endofilina. A anifisina por sua vez interage com a sinaptojanina. A sinaptojanina e a endofilina tem atividade modificadora de lipídeos: a sinaptojanina é uma inositol-5-fosfatase e a endofilina é uma ácido lisofosfatídico aciltransferase. Foi proposto que o produto da reação catalizada pela endofilina pode favorecer a deformação da bicamada lipídica da membrana, requisito para o brotamento da vesícula (Conner e Schmid, 2003).

1.2 OS PROTOZOÁRIOS TRIPANOSOMATÍDEOS

Protozoários flagelados da família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea) são agentes causadores de doenças parasitárias que têm uma alta incidência e um impacto econômico negativo em países em desenvolvimento. No caso da leishmaniose, causada por várias espécies de *Leishmania*, cerca de 16 milhões de pessoas estão infectadas na África, Ásia, partes da Europa e América Latina. A doença do sono, causada pelo *Trypanosoma brucei*, afeta cerca de 3 milhões de pessoas na África. A doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi*, afeta cerca de 16-18 milhões de indivíduos, e mais de 80 milhões estão em risco de infecção (Schmunis e Cruz, 2005; WHO, 1991).

Algumas espécies de tripanosomas são também importantes na medicina veterinária, uma vez que afetam seriamente animais de interesse econômico, tais como eqüinos e bovinos. Doenças causadas por tripanosomatídeos de plantas estão crescendo em importância, devido aos graves problemas que têm causado em plantações de coco e óleo de palma na América do Sul (De Souza et al., 2009).

1.2.1 O ciclo do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* (Figura 1.5) envolve dois hospedeiros: um inseto triatomíneo (hemípteros da família Reduviidae) e um mamífero que pode ser o homem (Chagas, 1909; revisto por Tyler e Engman, 2001). A transmissão ao mamífero é iniciada quando o inseto vetor libera formas tripomastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo, e estas ganham a corrente sanguínea por uma descontinuidade da pele. Esse estágio infectivo é capaz de alcançar o interior de células do hospedeiro vertebrado, local onde o parasita sofre total reorganização estrutural e ocorre a diferenciação para formas amastigotas. Estas se dividem e se diferenciam então a formas tripomastigotas sanguíneas, que são liberadas para o sangue do hospedeiro. Estas últimas formas podem eventualmente ser capturadas por um novo inseto vetor. No tubo digestivo do inseto as formas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas, que se multiplicam e após estresse nutricional ocorrido no intestino do vetor se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas (processo de metaciclogênese) que são capazes de infectar outros mamíferos. O processo de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas pode

ser mimetizado *in vitro* utilizando-se um meio de cultivo (meio TAU, Triatomine Artificial Urine) que mimetiza a urina do inseto vetor (Contreras et al., 1985).

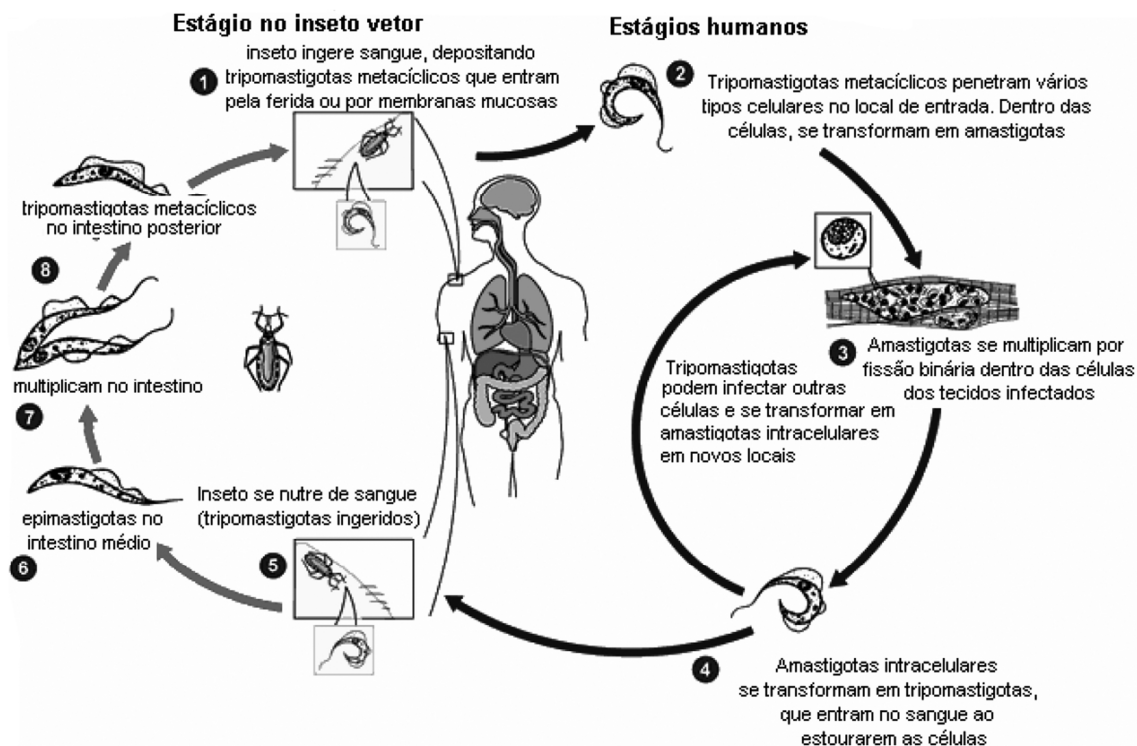


Figura 1.5. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.2.2 Biologia celular de *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui uma **mitocôndria** única que se estende por toda a célula. Na porção anterior do parasita a mitocôndria forma uma região onde se encontra uma matriz complexa de DNA, conhecida como cinetoplasto (Figura 1.6). O cinetoplasto é uma estrutura peculiar de organismos pertencentes à ordem Kinetoplastea (De Souza, 2002).

A **superfície celular** de *T. cruzi* apresenta um discreto glicocálice, se comparado ao do *T. brucei*, sendo que em todas as formas evolutivas de *T. cruzi* ele é constituído por proteínas periféricas e proteínas integrais que se projetam para o lado externo da célula. Além disso, há um grande número de macromoléculas ligadas à membrana plasmática por meio de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A superfície celular de *T. cruzi* é composta pela membrana plasmática e por microtúbulos subpeliculares, não se conhecendo nenhuma outra célula eucariótica

que tenha uma associação tão forte entre estas estruturas. Essa associação é extremamente resistente a efeitos mecânicos, de temperatura e drogas (De Souza, 2002).

Todos os membros da família *Trypanosomatidae* apresentam um **flagelo** anterior, que emerge de uma invaginação da membrana que reveste o corpo celular e forma a bolsa flagelar. Na forma amastigota o flagelo é muito curto, muitas vezes permanecendo dentro da bolsa flagelar. Nas formas epimastigotas e tripomastigotas parte do flagelo encontra-se aderida ao corpo, promovendo uma ondulação na membrana plasmática quando ocorre o batimento flagelar. Ao sair da bolsa flagelar a membrana do flagelo estabelece um contato bastante íntimo com a membrana que reveste a região de transição entre o corpo celular e a bolsa flagelar. Esse contato é importante no sentido de estabelecer uma barreira de comunicação entre o meio extracelular e a bolsa flagelar. Muito possivelmente nessa região existe um controle sobre a natureza dos componentes que entram na bolsa flagelar e que poderão ser posteriormente ingeridos por um mecanismo de endocitose (De Souza, 2002).

Outra organela característica dos Kinetoplastea é o **Glicosomo**. Trata-se de uma organela envolvida por membrana, que contém praticamente todas as enzimas da via glicolítica. Pode-se considerar o glicosomo como um tipo especializado de peroxisomo (Oppendoes e Michels, 1991).

O **retículo endoplasmático liso e rugoso** pode ser encontrado por todo o corpo de todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Os ribossomos estão distribuídos por todo o citoplasma, muitas vezes organizados na forma de polisomos. O complexo de Golgi é único e está sempre presente, localizado entre o núcleo e o cinetoplasto (De Souza, 2002).

O **Acidocalcisomo** é uma organela citoplasmática rica em cálcio e fosfato e de pH ácido. As formas amastigotas tem um número maior dessas organelas que as formas epimastigotas e tripomastigotas. Essa observação é de grande interesse, uma vez que a forma amastigota vive em um ambiente intracelular, onde normalmente a concentração de cálcio é baixa. Assim, o parasita parece ter desenvolvido um mecanismo especial de acúmulo de cálcio em uma estrutura especializada (Do Campo e Moreno, 1999).

O **núcleo** de *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos apresenta uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas, a membrana nuclear apresentando

poros típicos (De Souza, 2002). Entretanto, a divisão nuclear ocorre por endomitose (sem dissolução da membrana nuclear).

O citoplasma compreendido entre o núcleo e a bolsa flagelar concentra o complexo de Golgi e uma complexa rede de túbulos e vesículas, além de outras estruturas associadas à bolsa flagelar e relacionadas à osmo-regulação (Figura 1.6). A curta distância entre esta rede de túbulos e vesículas e a bolsa flagelar permite que vesículas trafeguem rapidamente entre os compartimentos celulares, aumentando a eficiência do transporte (Briekman et al., 1995).

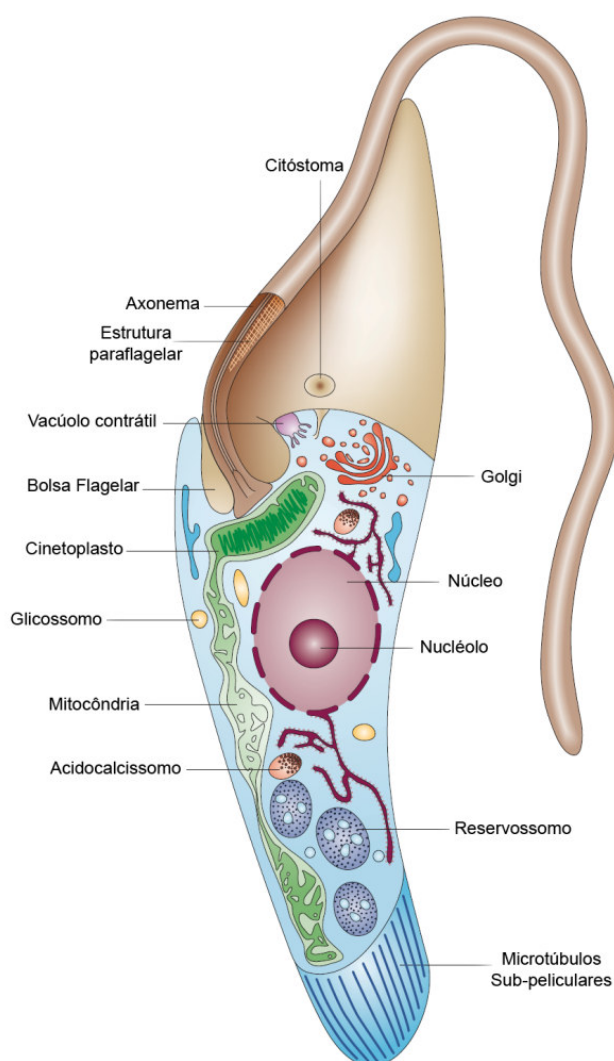


Figura 1.6. Esquema das principais estruturas celulares de *T. cruzi* (Fonte: DO CAMPO *et al.*, 2005).

1.2.3 Endocitose em protozoários

A endocitose é essencial para a sobrevivência de células eucarióticas e tem sido bem caracterizada em células de mamíferos e leveduras. Entre os protozoários, além de ser um sistema de captação de material extracelular, para atender às necessidades nutricionais do parasita e apoiar a intensa proliferação característica de algumas fases do ciclo de vida, também tem um papel ativo e fundamental na virulência e evasão do sistema imune do hospedeiro (Morgan et al., 2002).

Existem muitas diferenças entre protozoários e eucariotos superiores, tornando-os, dessa forma, um modelo atrativo no estudo de mecanismos de endocitose (De Souza et al., 2009). Protozoários parasitas representam um pequeno grupo de eucariotos. No entanto, a diversidade de características na via endocítica é alta e entre diferentes protozoários a atividade endocítica varia, bem como entre os diferentes estágios evolutivos em alguns protozoários. Protozoários parasitas anaeróbios, como *Trichomonas*, *Giardia* e *Entamoeba*, são organismos fagocíticos muito eficientes. Neste grupo o processo evoluiu para uma via endocítica polarizada: enquanto tricomonas e ameba são capazes de formar vesículas de endocitose em qualquer lugar de sua superfície celular, o brotamento de vesículas na *Giardia* é restrito à superfície dorsal (De Souza et al., 2009). Em Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*), dados ultraestruturais relativos à endocitose ainda não são conclusivos.

Em protozoários tripanosomatídeos o processo de endocitose é extremamente polarizado, com a captação de carga confinada à bolsa flagelar em *Leishmania* e *T. brucei* ou distribuída entre a bolsa flagelar e o citóstoma em epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. O conhecimento sobre a via endocítica de *T. cruzi* ainda é pobre quando comparado com *T. brucei* e *Leishmania*, principalmente devido à ausência de marcadores moleculares. Sendo a endocitose um processo essencial para a sobrevivência dos parasitas, as diferenças entre as moléculas e organelas envolvidas na via endocítica do parasita e das células do hospedeiro certamente prometem ser uma boa fonte de alvos quimioterápicos (De Souza et al., 2009).

1.2.4 Endocitose em *T. cruzi*

Todas as formas evolutivas de *T. cruzi* são capazes de ingerir macromoléculas do meio extracelular por uma via endocítica. Embora faltem estudos quantitativos, os dados disponíveis indicam que a atividade endocítica é maior na forma epimastigota, decrescendo na forma amastigota e sendo muito pequena na forma tripomastigota (De Souza et al., 2009).

Nos tripanosomatídeos a membrana plasmática está disposta sobre um arcabouço de microtúbulos, estabilizados por ligações cruzadas e associados com a própria membrana. Devido a este arcabouço, invaginações de membrana são dificultadas na maior parte da superfície do protozoário. No entanto, este arranjo de microtúbulos é descontínuo na porção anterior da célula, onde há uma grande invaginação da membrana plasmática, a bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge da célula e local em que ocorre a endocitose (Morgan et al., 2002).

O *T. cruzi*, ao contrário dos tripanosomas africanos, apresenta uma estrutura típica diretamente envolvida na captação de macromoléculas (além da bolsa flagelar): o citóstoma/ citofaringe. Esta estrutura é uma invaginação especializada na membrana plasmática que penetra profundamente no citoplasma, terminando na porção posterior da célula após o núcleo. A invaginação (citofaringe) apresenta sua abertura para o meio externo (citóstoma) localizada lateralmente ao corpo da célula, próximo à região da bolsa flagelar (Milder e Deane, 1969; De Souza, 2002).

O citóstoma está presente apenas em formas epimastigotas e amastigotas, sendo uma região de grande interesse, uma vez que a maior parte da atividade endocítica no *T. cruzi* ocorre a partir desta estrutura, ao invés de ocorrer via bolsa flagelar (Porto-Carreiro et al., 2000; VataruNakamura et al., 2005). Assim, o *T. cruzi* se apresenta como uma célula polarizada, com duas estruturas relacionadas à endocitose: citóstoma e bolsa flagelar.

Macromoléculas são endocitadas mediante pequenas vesículas que se formam na bolsa flagelar e na porção final do citóstoma. As vesículas formadas migram para a região mediana e posterior da célula e fundem-se com estruturas maiores, localizadas preferencialmente na região posterior, dando origem aos reservosomos, estruturas especializadas no acúmulo de macromoléculas externas endocitadas. O pH no interior da organela é de cerca de 6,0, colocando-a como um compartimento pré-lisosomal. Durante a diferenciação de epimastigota para

tripomastigota a organela involui, sendo não encontrada na forma tripomastigota (Soares et al., 1992).

Assim, os reservosomos são considerados os principais locais de degradação de proteínas. Duas hidrolases de reservosomos são bem caracterizadas em *T. cruzi*: cruzipaína e serino carboxipeptidase. Cruzipaína é considerada um fator fundamental na virulência para o *T. cruzi* durante a invasão da célula hospedeira e para sobrevivência intracelular. A serino carboxipeptidase catalisa a hidrólise da porção carboxi-terminal de proteínas e peptídeos. A morfologia dos reservosomos é anormal após longos períodos de estarvação (De Souza et al., 2009).

Os reservosomos são comparados aos endosomos tardios de mamíferos, (Soares et al., 1992). Essas organelas são de particular interesse, pois são encontradas exclusivamente no sub-gênero *Schyzotrypanum* em espécies tais como *T. vespertilionis*, *T. dionisii* e *T. cruzi* (Soares e De Souza, 1991; De Figueiredo e Soares, 2000).

Diferenças morfológicas e fisiológicas entre tripanosomas africanos e o *T. cruzi* limitam as extrapolações dos mecanismos de captação de nutrientes observados nos tripanosomas africanos para o *T. cruzi*, e por outro lado justificam melhores análises em *T. cruzi* em relação aos fenômenos relacionados à captação de macromoléculas.

1.2.5 Clatrina em tripanosomatídeos

Está bem estabelecido que os tripanosomatídeos são capazes de ingerir macromoléculas do meio externo por meio de processos endocíticos típicos pela bolsa flagelar. *Leishmania*, *T. brucei* e *T. cruzi* tem pelo menos uma forma evolutiva com alta atividade endocítica. Em *T. brucei* e *Leishmania* a endocitose é relacionada à nutrição e evasão do sistema imune do hospedeiro. Em *T. brucei* o processo endocítico é bem conhecido e similaridades com eucariotos superiores vêm sendo encontradas, o que demonstra que a maquinaria endocítica é conservada e segue os mesmos mecanismos básicos que tem sido descritos em mamíferos. Isto envolve a presença de receptores de superfície, montagem de vesículas revestidas por clatrina, e a presença de endosomos iniciais, tardios e lisosomos (De Souza et al., 2009). Entretanto, pouco se sabe sobre os processos que ocorrem em *Leishmania* e *T. cruzi* e a pouca informação que se tem é controversa. Os dados sobre a via

endocítica de *T. cruzi* sugerem um modelo que difere daqueles existentes em vias endocíticas de mamíferos e de *T. brucei* (De Souza et al., 2009).

Em *T. brucei* vesículas revestidas por clatrina já foram observadas brotando da bolsa flagelar e da rede Trans-Golgi. A depleção da clatrina é letal, indicando que essa molécula é essencial para a sobrevivência do parasita. Além disso, RNA de interferência de clatrina resultou em um grande inchaço da bolsa flagelar, gerando um fenótipo chamado "Big Eye". Embora o comprometimento da expressão da clatrina resultasse na incapacidade de absorção de nutrientes do meio externo, o processo exocítico permaneceu inalterado. Estas observações, juntamente com a ausência do gene da caveolina no genoma do *T. brucei*, sugerem fortemente que a endocitose mediada por clatrina é a principal via de ingestão de nutrientes neste parasita (Allen et al., 2003).

Em *Leishmania* a clatrina foi imunolocalizada em estruturas vesiculares ao longo do corpo do parasita, mas concentrada na porção anterior de formas amastigotas e promastigotas. Em *T. brucei* (Morgan et al., 2001; Allen et al., 2003) e *Leishmania major* (Denny et al., 2005), clatrina e os complexos adaptadores foram caracterizados por bioinformática.

Em *T. cruzi*, a evidência da endocitose mediada por receptor foi relatada em formas epimastigotas (Soares e De Souza, 1991; Porto-Carreiro et al., 2000). Análises ultra-estruturais da endocitose de albumina marcada com ouro coloidal permitiram identificar o brotamento de vesículas a partir da bolsa flagelar e do complexo de Golgi, contendo o típico revestimento externo que em outros modelos celulares têm sido descrito como clatrina (Sant'anna et al., 2004; Corrêa et al., 2007).

Já foi demonstrada em formas epimastigotas de *T. cruzi* a ligação e captação de transferrina e LDL marcados com ouro coloidal tanto através da bolsa flagelar, quanto através do citóstoma. No entanto, não foi observado nenhum tipo de revestimento na superfície das vesículas que brotam do citóstoma. Estabeleceu-se então que a endocitose em *T. cruzi* ocorre através de vesículas endocíticas com ou sem revestimento (Figura 1.7), que brotam a partir de dois distintos sítios que apresentam como destino final a fusão com o compartimento do reservosomo (Soares et al., 1992; De Figueiredo e Soares, 2000; Porto-Carreiro et al., 2000; Corrêa et al., 2007).

Recentemente Corrêa e colaboradores (2007) identificaram em base de dados genômicos do *T. cruzi* a presença do conjunto completo de genes necessários à expressão das proteínas que atuam no brotamento de vesículas revestidas por clatrina nesses parasitas (cadeia pesada de clatrina, adaptinas e dinamina). Além dos dados computacionais, a expressão da clatrina em *T. cruzi* foi demonstrada por *Western blot* utilizando anticorpos policlonais feitos para a cadeia pesada de clatrina bovina. A proteína foi localizada por imunofluorescência na região do complexo de Golgi e da bolsa flagelar. Curiosamente, agentes que perturbam a endocitose mediada por receptor não alteram a endocitose de transferrina em formas epimastigotas (Corrêa et al., 2008). Ao contrário de *T. brucei*, *T. cruzi* possui os genes do complexo adaptador AP2 em seu genoma (Allen et al., 2003; Denny et al., 2005; Corrêa et al., 2007), indicando que este parasita parece ter atividade endocítica mediada por vesículas revestidas por clatrina.

Em resumo, há um peculiar sistema de endocitose em *T. cruzi* envolvendo pelo menos dois diferentes mecanismos separados fisicamente em dois domínios da membrana (Figura. 1.7). A endocitose mediada por clatrina estaria restrita à bolsa flagelar, enquanto que a endocitose independente de clatrina ocorreria majoritariamente pelo citóstoma (Corrêa, 2007). Essas observações fazem do *T. cruzi* um excelente modelo para estudos da endocitose, um dos fenômenos mais primitivos e essenciais à manutenção da vida nas células eucarióticas.

Embora a endocitose em *T. cruzi* venha sendo estudada há bastante tempo, tais estudos não tem contemplado os eventos iniciais que ocorrem nos diferentes domínios da membrana desse protozoário. Um estudo ultra-estrutural em formas epimastigotas de *T. cruzi* indicou a presença de vesículas com revestimento análogo ao de clatrina na região da bolsa flagelar (Corrêa et al., 2007).

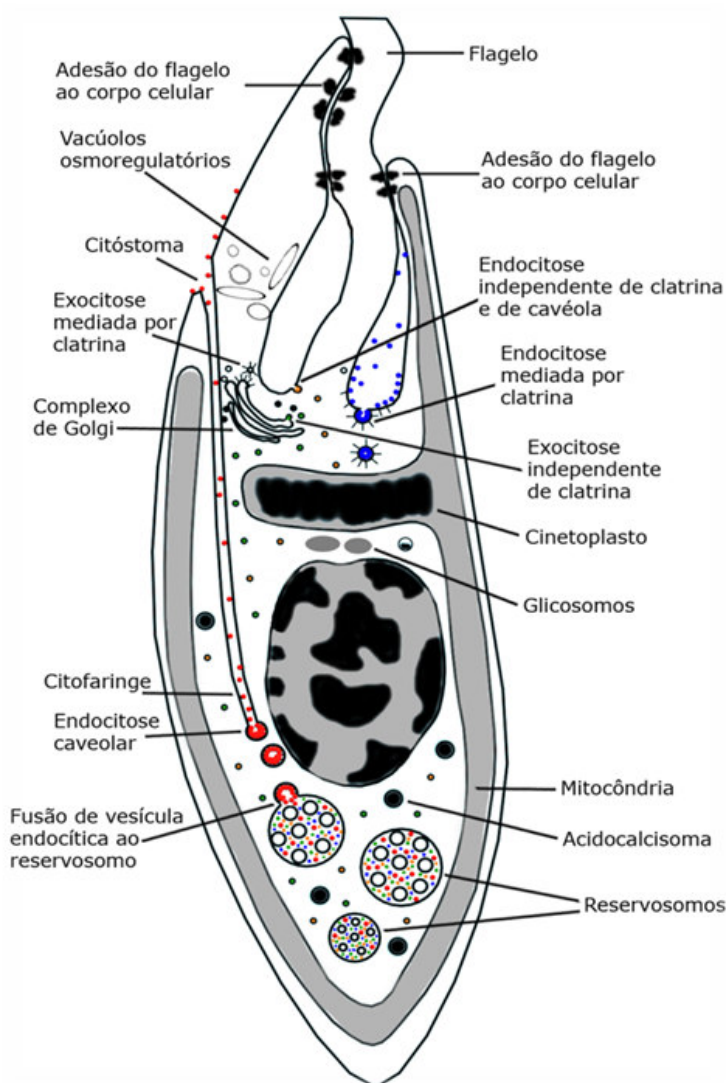


Figura 1.7. Modelo hipotético para endocitose em *T. cruzi*. J. R. Corrêa, tese de Doutorado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC/Fiocruz, RJ. Dados não publicados.

No entanto, uma descrição definitiva dos componentes deste revestimento e sua função molecular em *T. cruzi* permanece em aberto. Assim, avaliar a participação da clatrina (bem como seus adaptadores) nos eventos iniciais de endocitose em *T. cruzi*, bem como sua localização sub-celular, é o objetivo central dessa dissertação. Para os tripanosomatídeos a obtenção de nutrientes se constitui um dos principais desafios à sobrevivência no interior do hospedeiro, seja ele invertebrado ou vertebrado. Estudar os mecanismos deste processo é de grande importância na tentativa de elucidar o funcionamento do portal endocítico.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho é avaliar a expressão da clatrina em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, bem como sua localização sub-celular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar por análise bioinformática os genes para cadeias pesada e leve de clatrina, assim como de sub-unidades do complexo adaptador 2, no genoma de *T. cruzi* (www.geneDB.org);
- 2) Produção de clatrina e adaptinas recombinantes a partir da amplificação e clonagem dos genes em vetores de expressão em bactérias e usar essas proteínas recombinantes para obtenção de antisoros policlonais;
- 3) Avaliar a expressão dos genes da clatrina e adaptinas durante a diferenciação do *T. cruzi* (isto é, em formas epimastigotas, formas de transição e formas tripomastigotas metacíclicas) por Western blot;
- 4) Avaliar a expressão dos genes selecionados em outros tripanosomatídeos (*Blastocrithidia culicis*, *Crithidia deanei*, *C. fasciculata*, *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma brucei*) por Western blot, usando os anticorpos específicos de *T. cruzi*;
- 5) Identificar a localização celular das proteínas selecionadas em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* por microscopia confocal (imunofluorescência), bem como sua localização ultra-estrutural por imunolocalização em microscopia eletrônica de transmissão, usando os anticorpos específicos de *T. cruzi*;
- 6) Identificar a localização celular das proteínas selecionadas em outros tripanosomatídeos (*Blastocrithidia culicis*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *P. serpens* e *T. brucei*) por microscopia confocal (imunofluorescência), usando os anticorpos específicos de *T. cruzi*;
- 7) Obter mutantes deficientes em clatrina para avaliar o fenótipo resultante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS

3.1.1 Reagentes

Amersham Bioscience: dNTPs; Membrana de nitrocelulose Hybond C; anticorpo monoclonal anti-GST, Anti-IgG de camundongo, *Taq* DNA polimerase

Appligene: IPTG

Bio-Rad: Acrilamida; Agarose (UltraPure DNA grade); Azul de Bromofenol; Bis-Acrilamida; Persulfato de Amônio

Cult-lab: Soro fetal bovino (SFB)

Difco: Bacto tripton; Extrato de levedura; Infuso de fígado; Triptose

Electron Microscopy Science: Paraformaldeído; poli-L-lisina; Cloridrato de Ouro.

GElifesciences: pGEX-4T₁

Invitrogen Inc.: EDTA; Fenol; TRIS; IPTG; Agarose; Marcador de massa molecular Benchmark, Alexa Flúor 488; Gateway® *BP Clonase*™ II, Gateway® *LR Clonase*™ II, Gateway® pDONR™221, *kit PCR Platinum® Pfx*, Hoechst 33342 DNA staining; SDM79

Merck: Acetato de Sódio; Ácido Acético Glacial, Ácido clorídrico, Bicarbonato de Sódio; Carbonato de Sódio, Cloreto de Cálcio; Cloreto de magnésio; Cloreto de Potássio; Cloreto de Sódio; Clorofórmio, Etanol Absoluto; Formaldeído; Glicina; Glicose; Metanol; SDS; Sulfato de magnésio; Hidróxido de sódio; Isopropanol; Fosfato diabásico de sódio

Microbiológica: Hemina

New England Biolabs: Endonucleases de restrição e Tampões, 1 kb Plus DNA Ladder.

Promega: Tripsina, NBT, BCIP

Qiagen: QIAprep spin miniprep kit

Serva Electrophoresis: Alu-Gel

Sigma: Acetato de amônio; Ácido bórico; Amberlit; Ampicilina; Anti-mouse IgG conjugado a ouro coloidal 10nm; β-mercaptoetanol; Brometo de Etídeo; BSA; Cacodilato de Sódio; Cloreto de amônio; Cloreto de Magnésio; Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM); DEAE-celulose; Glicerol; Glutaraldeído; Ficoll; Canamicina;

Ponceau S; Schneider; TEMED; Transferrina; Triton-X-100; Tween 20; adjuvante completo de Freund

USB Corporation: Persulfato de amônio; *T4 DNA Ligase*; Tris; Uréia

3.1.2 Meios de cultura

LB: Triptona 1%, extrato de levedura 5% e NaCl 1%

Meio LB agar: Meio LB suplementado com 15 g/l de ágar

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, soro fetal bovino 10% e extrato de levedura 15 g/l

Meio TAU: NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0

Meio TAU3AAG: meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM

3.1.3 Tampões e Soluções

Fenol/Clorofórmio: 25 partes de fenol saturado; 24 partes de clorofórmio; 1 parte de álcool isoamílico

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM

PSG: Na₂HPO₄ (anidro) 47,47 mM, NaH₂PO₄ · H₂O 2,5 mM, NaCl 36,76 mM, e glicose 55,5 mM

Solução de suspensão de corpúsculo: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M e Triton X-100 2%

Solução de bloqueio para imunocitoquímica: PBS pH 8,0; BSA 1,5%; Tween 20 0,01%

Solução de bloqueio para imunofluorescência: PBS e BSA 1%

Solução de bloqueio para *western blot*: PBS, Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5%

Solução de lise para *Toothpick*: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025 %

Solução Ponceau S: Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%

Solução de coloração para géis de proteína: Coomassie blue R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%)

Solução para descoloração de géis de proteína: Metanol 4%, ácido acético 7,5 %

Tampão da Fosfatase alcalina: Tris-HCl pH 9,5 1M, NaCl 5M, MgCl₂ 5M

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%

Tampão de amostra para proteína 4X: Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%

Tampão para transferência (western blotting): Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%

Tampão TBE: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM

3.1.4 Organismos

Escherichia coli

Linhagens: TOP10F'; DH5α

Mus musculus

Linhagem Swiss

Trypanosoma cruzi

Clone: Dm28c, isolado do mamífero *Didelphis marsupialis*, nas formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e amastigotas.

Leishmania major

Formas promastigotas

T. brucei

Formas procíclicas

Blastocrithidia culicis

Crithidia deanei

Crithidia fasciculata

Phytomonas serpens

3.2 CULTIVO DE PARASITAS

Neste trabalho foi utilizado o clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi* (Contreras et al., 1985; Contreras et al., 1988) nas formas epimastigotas de cultura, epimastigotas em estresse nutricional, epimastigotas após 24h em diferenciação, tripomastigotas metacíclicas e amastigotas.

Também foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania major*, formas tripomastigotas procíclicas de *Trypanosoma brucei*, formas epimastigotas de *Blastocrithidia culicis*, formas promastigotas de *Phytomonas serpens*, e formas coanomastigotas de *Crithidia deanei* e *Crithidia fasciculata*.

3.2.1 Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas a 28°C em meio LIT (Camargo, 1964) com passagens semanais e inóculo de $1,0 \times 10^6$ células/ml. Para os experimentos, formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação a 7000 x *g* por 5 min no quinto dia de cultivo (correspondente à fase logarítmica de crescimento, com base em curva de crescimento realizada nas mesmas condições).

3.2.2 Tripomastigotas metacíclicos e formas em diferenciação de *Trypanosoma cruzi*

Formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (Contreras et al., 1985; Bonaldo et al., 1988; Contreras et al., 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular $5-7 \times 10^7$ células/ml) foram coletadas por centrifugação a 7000 x *g* por 5 min a 10°C, ressuspensas em meio TAU na concentração de $5,0 \times 10^8$ células/ml e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 300 cm² contendo 200 ml de meio TAU3AAG (concentração final de $5,0 \times 10^6$ células/ml). Após 72 horas de cultivo as formas tripomastigotas metacíclicas liberadas no sobrenadante foram coletadas e purificadas por passagem através de uma coluna de afinidade contendo a resina DEAE celulose equilibrada em PSG.

Para alguns experimentos também foram utilizadas as formas epimastigotas em estresse nutricional em meio TAU e formas epimastigotas após 24 horas de diferenciação em meio TAU3AAG.

3.2.3 Amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para a obtenção de formas amastigotas, tripomastigotas metacíclicos foram usados para infectar células VERO (ATCC nr. CRL-1586), que foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Formas amastigotas intracelulares foram obtidas após 10 dias de infecção. As formas amastigotas liberadas no sobrenadante foram coletadas por centrifugação a 1000 x *g* por 5 min.

3.2.4 Outros Tripanosomatídeos

Formas promastigotas de *Leishmania major* foram cultivadas a 28°C em meio Schneider suplementado com SFB a 10% e hemina à 10 mg/l, com passagens semanais. Formas tripomastigotas procíclicas de *T. brucei* foram cultivadas a 28°C em meio SDM79 suplementado com SFB a 10% e hemina a 10 mg/l, com passagens semanais. *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia deanei* e *Crithidia fasciculata* foram cultivadas a 28°C em meio LIT suplementado com SFB a 10% com passagens diárias. *Phytomonas serpens* foi cultivada a 28°C em meio GYPMY (Itow-Jankevicius et al., 1993) com passagens a cada 3 dias.

3.2.5 Obtenção de extrato proteico de tripanosomatídeos

Os parasitas foram cultivados como descrito acima. Para a produção de extratos protéicos, $2,0 \times 10^8$ células foram coletadas por centrifugação (7000 x *g*, 10 min a 10°C) e lavadas duas vezes em PBS pH 7,5. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em uma solução contendo 150 µl de PBS, 50 µl de tampão de amostra para proteína 4X e acrescido de PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride) a 1 mM. As células foram incubadas por 5 min a 95°C, sonicadas (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co) por 3 segundos em microtip na potência 2 e em seguida resfriadas em gelo, a uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/µl.

3.3 SELEÇÃO DE GENES

Os genes selecionados para este trabalho (Tabela 1) foram identificados anteriormente por Corrêa et al. (2007), com exceção do gene para a cadeia leve da clatrina, que foi identificado pelo grupo de bioinformática do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz-PR.

TABELA 1 – GENES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* SELECIONADOS

Gene	Identificação	Tamanho pb	Tamanho kDa
Clatrina - Cadeia pesada	Tc00.1047053506167.50	5115	192,8
Clatrina - cadeia leve	Tc00.1047053506211.240	648	23,3
Subunidades do Complexo Adaptador AP2 – Membrana plasmática			
Adaptina $\alpha 2$	Tc00.1047053511391.140	2895	108,3
Adaptina $\beta 2$	Tc00.1047053506247. 200	2898	106,1
Adaptina $\mu 2$	Tc00.1047053510105.30	1250	47,5
Adaptina $\sigma 2$	Tc00.1047053506559.330	432	16,9

3.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes selecionados foram construídos com base na sequência codificante de cada gene selecionado de *T. cruzi* disponível no banco de dados genéticos (www.genedb.org). À extremidade de cada iniciador foi acrescentada uma sequência de nucleotídeos correspondente aos sítios para endonucleases de restrição específicas para clonagem no vetor de expressão em *E. coli* (Ver Tabela 2).

O vetor de expressão utilizado foi o pGEX-4T₁ (Figura 3.1). Este plasmídeo nos permitiu clonar o gene de interesse fusionado ao gene da GST (Glutathione-S-Transferase). Este plasmídeo confere à bactéria resistência à ampicilina.

As amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas com Taq DNA polimerase, na presença de tampão Taq DNA polimerase 1x, 100 ng de DNA total de *T. cruzi* (cedido por Rosana Gonçalves Pinho, ICC-FIOCRUZ), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, e água qsp 100 µl.

As mesmas concentrações de reação foram utilizadas para todos os genes. As reações foram submetidas a 35 ciclos de PCR: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento dos iniciadores por 30 segundos a 55°C e polimerização por 1-2 min a 72°C, dependendo do tamanho do gene. Antes do primeiro ciclo, as reações foram mantidas por 4 min a 94°C. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler.

Os produtos da amplificação foram purificados por extração com fenol/clorofórmio. Para isso, ao material amplificado foi adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio, seguindo-se centrifugação a 13 000 x *g* por 2 min e precipitação com etanol na presença de acetato de sódio a 0,3 M, pH 6,0 por 30 min em gelo seco. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000 x *g* e lavado com etanol 70%. Após secar a temperatura ambiente, o DNA foi diluído em tampão TE contendo RNase a 20 µg/ml e quantificado por espectrofotometria UV a 260 nm.

A amplificação foi verificada através de eletroforese de DNA em matriz de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras foram

diluídas em tampão de amostra de DNA 10x e aplicadas na matriz de agarose 0,8% em TBE, juntamente com o padrão de massa molecular (1 Kb Plus). Essa matriz de agarose contendo as amostras foi submetida a tensão de cerca de 100V durante tempo variável. O DNA foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador. O perfil eletroforético foi registrado em um sistema de foto documentação UVP (Biorad).

O material amplificado e purificado (inserto) foi digerido com as enzimas de restrição adequadas (Tabela 2) na relação molar de 3:1 (inserto:plasmídeo), com uso de 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20 µl, por 16 h a 37°C. O material foi novamente purificado por extração em fenol/clorofórmio.

3.5 LIGAÇÃO DOS GENES NOS VETORES DE EXPRESSÃO

O inserto foi ligado ao vetor, previamente digerido com as enzimas de restrição adequadas (Tabela 2) em volume de reação de 10 µl, contendo tampão da enzima T4 DNA ligase e uma unidade da enzima T4 DNA ligase (USB). A reação foi incubada a 16°C por 18 h, gerando um clone, o qual foi usado para transformar a cepa TOP10F' de *E. coli* competente por tratamento com cloreto de cálcio (cepa cálcio-competente).

TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Gene	Oligonucleotídeos	Enzima	Tamanho pb
Clatrina Cadeia pesada	F – 5'ATGAACGGCCCCCTTGACGACA3'	<i>Sall</i>	1360
	R - 5'TGACAGACCCACCTTTCGGCACAAC3'	<i>NotI</i>	
Cadeia leve	F – 5' ATGGACCCTTTTGAAGGAAGC3'	<i>BamHI</i>	651
	R - 5'TTATTGAGCGGTTTCGCCCT3'	<i>Sall</i>	
Subunidades do Complexo Adaptador AP2 – Membrana Plasmática			
Adaptina α2	F - 5'ATGGACATGCGTGGACTGGCTC3'	<i>EcoRI</i>	1080
	R - 5'TCACAATTGTGACAGCAAATAAACCC3'	<i>Sall</i>	
Adaptina β2	F - 5'ATGGATGCCGTATTGCGAAAGGT3'	<i>Sall</i>	1080
	R - 5'TCACGCAGTTTTTCCAGCTTAACATAGGGC3'	<i>NotI</i>	
Adaptina μ2	F – 5'ATGATTGGCGTTCTAATGTTTTTGA3'	<i>Sall</i>	1251
	R – 5'TCACCACCTCGTATTGGCCTGTTGTCGTCA3'	<i>NotI</i>	
Adaptina σ2	F – 5'ATGATACATTTTATCCTTTTGCAGAACCG3'	<i>EcoRI</i>	432
	R – 5'TCACGTGTTTGTGATGTCGAGAGTCC3'	<i>Sall</i>	

3.6 TRANSFORMAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

Os clones foram incubados com bactérias cálcio-competentes por 30 min a 4°C e então realizado choque térmico (1 min 42°C, 2 min 4°C) para inserção dos clones. Em seguida, 1 ml de meio LB foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora e semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB, agar 1,5% e ampicilina 100 µg/ml). Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados mediante a técnica de palitagem.

3.7 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES ATRAVÉS DA TÉCNICA DA PALITAGEM (TOOTHPICK)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de microcentrifuga e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias a serem analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µl do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, usando o plasmídeo original como controle, a fim de selecionar as colônias positivas. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água ultra-pura e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

3.8 PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PRODUTOS DE PCR

As colônias positivas foram selecionadas e inoculadas em meio LB contendo o antibiótico de resistência (ampicilina) e cultivadas por 16 horas a 37°C sob agitação constante. As células obtidas foram centrifugadas a 12000 x *g* por 1 min e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do sistema “QIAprep spin miniprep kit” conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Nestas condições, cerca de 5 a 10 µg de DNA dos diferentes plasmídeos foram recuperados e utilizados para seqüenciamento de DNA (Macrogen, Korea), utilizando os oligonucleotídeos dos vetores.

3.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *ESCHERICHIA COLI*

Colônias recombinantes foram inoculadas em 20 ml meio LB com o antibiótico de resistência do plasmídeo (ampicilina 100 mg/ml) e cultivadas durante 16 horas a 37°C sob agitação (pré-inóculo). A seguir, as culturas foram inoculadas em 180 ml de meio LB/ampicilina e incubadas por uma hora a 37°C sob agitação. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM. Uma aliquota da cultura sem adição de IPTG (não induzida) foi reservada para servir de controle negativo da expressão. Ambas as culturas foram incubadas a 37°C por mais três horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000g por 2 min e ressuspensas em solução de suspensão de corpúsculo. A suspensão bacteriana foi lisada por ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co). Vinte microlitros desses extratos das culturas bacterianas (correspondentes à fração insolúvel da proteína) foram adicionados a 5 µl de tampão de amostra para proteínas 4x, sendo em seguida incubados por 5 min a 100°C. Cada amostra foi submetida a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), a 30 mA. Após a eletroforese as proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue R-250 e descoradas com trocas sucessivas de solução de descoloração para géis de proteína.

A expressão da proteína recombinante foi confirmada através de ensaio de imunodeteção (*Western blot* – Ver Item 3.10) (Towbin et al., 1979) usando anticorpos comerciais que reconhecem a etiqueta de GST conferida pelo plasmídeo.

3.10 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO

À fração insolúvel foi adicionado 1 mL de tampão de amostra para proteínas 4x e a fração foi purificada por eletroforese em gel preparativo de poliacrilamida a 8%, com 15 cm de largura por 10 cm de altura. O gel foi submetido a eletroforese por 16 horas a 20 mA. O gel foi corado com solução de KCl 100 mM, a banda correspondente foi cortada, inserida em uma membrana de diálise e eletroeluída por 2 horas a 60 Volts em tampão para eletroforese SDS-PAGE. E esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, resultando nas eluições E1, E2 e E3.

3.11 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

As proteínas recombinantes purificadas foram dosadas e inoculadas em camundongos da linhagem Swiss, por via intraperitoneal, com 5 aplicações de aproximadamente 20 µg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguindo-se obtenção do soro uma semana após a última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (na concentração de 1:1) na primeira inoculação, e em Alu-Gel nas inoculações subseqüentes.

A especificidade do antisoro produzido foi verificada por ensaio *Western blot*, onde extratos proteicos dos parasitas foram submetidos a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (8-15%) e posteriormente transferidos (*Western blot*) para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), na presença de tampão para transferência 1X (Towbin et al., 1979). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 min para visualização das bandas, lavada em água corrente e bloqueada em solução de bloqueio para *Western blot*, por 1 hora em temperatura ambiente ou por 16 horas a 4°C.

A membrana foi incubada com o antisoro diluído 1:200 em PBS/Tween 0,05% e leite desnatado 0,5% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada com PBS/Tween 0,05% e incubada com Anti IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina diluído 1:10 000 em PBS/Tween 0,05% e leite desnatado 0,5% por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi detectada pela reação em um kit contendo fosfatase alcalina, nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) em tampão de fosfatase alcalina, como recomendado pelo fabricante.

3.12 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER

Para os ensaios de imunofluorescência, os parasitas foram coletados por centrifugação a 6.000 x g por 1 min, lavados em PBS pH 7,2, ressuspensos em paraformaldeído a 4% e aderidos por 20 min a lamínulas recobertas com poli-L-lisina a 0,1%. O material foi então incubado com Triton X-100 a 0,1% diluído em PBS por 2 min a temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, incubadas em solução de bloqueio para imunofluorescência por 1 hora e em seguida incubadas por 1 hora com o antisoro policlonal correspondente diluído 1:150 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Posteriormente as lamínulas foram

lavadas com PBS e incubadas por 30 min com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488, diluído 1:600 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Após este tempo, as lamínulas foram incubadas por 5 min com o corante de DNA Hoechst 33342 diluído em PBS, lavadas em PBS e montadas com n-propil-galato sobre uma lâmina de microscopia ótica. O material foi observado no microscópio confocal LEICA SP5.

3.13 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram lavadas com PBS e fixadas por 60 min à temperatura ambiente em uma solução de glutaraldeído 0,1% / paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Após lavar os parasitas em tampão cacodilato 0,1 M, estes foram submetidos à etapa de desidratação: etanol 30% a 4°C por 30 min; etanol 50% a -20°C por 60 min; etanol 70% a -20°C por 60 min; etanol 90% a -20°C por 60 min; etanol 100% a -20°C por 60 min. Em seguida, o material foi infiltrado em solução metanol 100%: resina Lowicryl MonoStep na proporção de 2:1 a -20°C, por 16 horas. Após este tratamento, foi feita infiltração em solução metanol 100%: resina na proporção 1:1, novamente a -20°C por 16 horas e emblocamento no dia seguinte em resina pura para polimerização a -20°C por 48-72 horas em luz ultravioleta UVA (360 nm).

Cortes ultra-finos foram obtidos em ultramicrotomo Leica modelo M6, coletados em grades de níquel e incubados por 30 min em cloreto de amônio 50 mM em PBS. Em seguida as grades foram incubadas por 30 min em solução de bloqueio para imunolocalização e incubadas por 1 hora nesta mesma solução contendo o anticorpo primário diluído 1:20. Após duas lavagens, o material foi incubado por 1 hora com o anticorpo secundário complexado a ouro coloidal (10 nm) diluído 1:20 (ver item 3.13). Em seguida as grades foram lavadas em solução de bloqueio para imunolocalização e em água destilada. Finalmente as grades foram contrastadas por 30 min com acetato de uranila (5% em água) e por 2 min em citrato de chumbo e então observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL modelo 1200EXII de 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR).

3.14 COMPLEXAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL

Foi realizado a complexação de transferrina e albumina a partículas de ouro coloidal de 15 nm e de 60 nm, para utilização em microscopia eletrônica de transmissão. As soluções de ouro coloidal foram preparadas como descrito em Sloth e Geuze (1985).

Para a complexação, 250 µl da solução de proteína (1 mg/ml) foram adicionados a 10 ml da solução de ouro coloidal em tubos de centrifuga e adicionado ainda 1 ml de polietilenoglicol (PEG) a 1%. Esses tubos foram centrifugados durante 45 min a 4°C a 65000g sem a utilização de sistema de frenagem da centrífuga para não haver mistura dos sedimentos. Após a centrifugação houve a formação de dois sedimentos, um no fundo dos tubos correspondente ao material complexado proteína-ouro, e outro na parede do tubo correspondente às partículas de ouro não complexadas. O sedimento da parede e o sobrenadante foram então descartados e o sedimento do fundo do tubo foi ressuspenso em 1 ml de PBS pH 7,2 e estocado a 4°C.

3.15 COLOCALIZAÇÃO DE MARCADORES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram lavadas com PBS, incubadas por 30 min em PBS e em seguida incubadas por 30 min com soluções de proteína (transferrina e/ou albumina) complexadas a partículas de ouro coloidal. Em seguida, os parasitas foram fixados e processados para imunolocalização como descrito no item 3.12.

3.16 MUTAGÊNESE CONDICIONADA

A fim de se obter um mutante dominante negativo para clatrina em *T. cruzi*, um domínio de desestabilização foi fusionado à cadeia pesada de clatrina contendo uma mutação no domínio ATPase (Figura 3.2): a lisina na posição 184 foi substituída por uma alanina. Essa clatrina mutada será chamada de (TcCla^{K184A}). Essa mutação acarreta a perda da capacidade de hidrolisar ATP, que é imprescindível o funcionamento da clatrina.

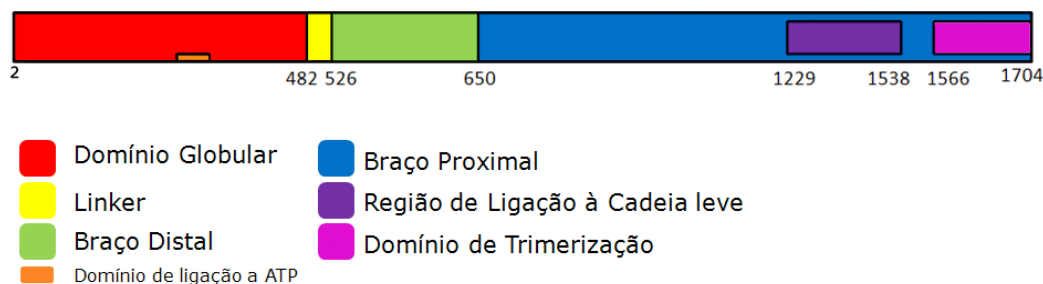


Figura 3.2. Domínios da cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi*. As posições dos domínios indicadas são equivalentes às da cadeia pesada de clatrina humana. O braço proximal contém a região de ligação à cadeia leve de clatrina e o domínio de trimerização.

Para isso, um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado para produzir a mutação e para a inserção no vetor pTcDD (Tabela 3).

TABELA 3 – INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE TCCLA^{K184A}

Iniciador	Sequencia
K184AF	5'AATGGTGGGA GCG ACACAACCTGTA3'
K184AR	5'TACAGTTGTGT CGC TCCCACCATT3'
ddCLAF	5'ATGAACGGGCCCTTGACGACAGC3'
ddCLAR	5'GTACGGCCTCCTGTTGTCA3'

Em destaque a substituição do códon da lisina por alanina. Os iniciadores ddCLA foram acrescidos dos sítios de recombinação attB, para inserção na plataforma Gateway de clonagem.

3.16.1 Amplificação do gene da TcCla^{K184A}.

A amplificação do gene (TcCla^{K184A}) por PCR (método descrito no item 3.3) foi feita em duas fases (Figura 3.3). Primeiro foram utilizados dois conjuntos de oligonucleotídeos (K184AF + ddCLAR e ddCLAF + K184AR) conforme o desenho abaixo, gerando dois fragmentos de 4572pb e 560pb, respectivamente. Após a amplificação os fragmentos foram purificados com fenol/clorofórmio e precipitados com etanol absoluto e acetato de sódio (como descrito no item 3.3).

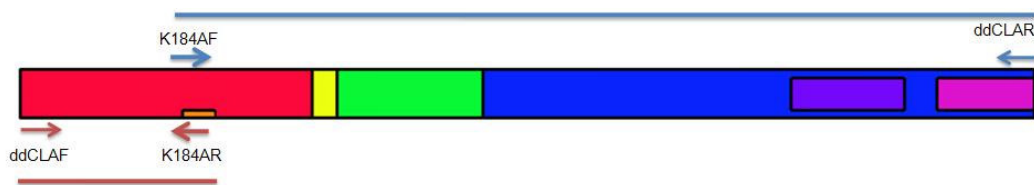


Figura 3.3. Esquema de amplificação de TcCla^{K184A} em duas fases. Em vermelho o fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos ddCLAF + K184AR e em azul os fragmentos amplificados por K184AF + ddCLAR.

Tendo os produtos purificados, estes foram incubados juntos a 94 °C, temperatura em que o DNA é desnaturado. Em seguida, resfriados até temperatura ambiente para fusão dos dois produtos de PCR. Esse material foi usado em uma segunda amplificação, usando os oligonucleotídeos ddCLAF e ddCLAR, a qual resultou em um produto de 5115 pb contendo a mutação K184A. Esse segundo amplicon foi purificado com PEG e usado para clonagem.

3.16.2 Clonagem do gene da TcCla^{K184A} em vetor de entrada pDNOR-221 do Sistema Gateway

O vetor pTcDD é um vetor que se utiliza da plataforma Gateway de clonagem (InvitrogenTM), baseada nas propriedades de recombinação do bacteriófago lambda (Landy, 1989). A entrada da sequência na plataforma Gateway é feita inicialmente com o vetor pDONRTM221 (InvitrogenTM, Figura 3.4) mediante reação de Recombinação BP.

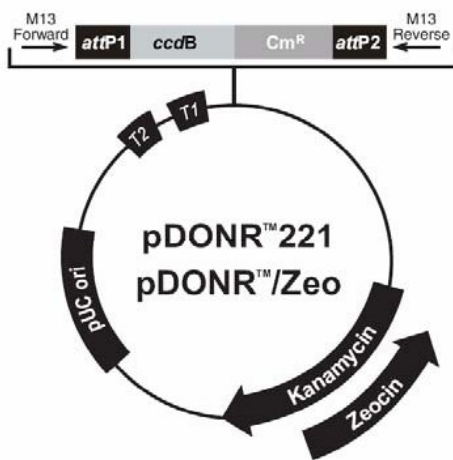


Figura 3.4. Vetor de entrada utilizado, pDONR 221(InvitrogenTM).

A reação de recombinação com BP foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway BP clonase II Enzyme mix*, InvitrogenTM). Para isso foram utilizados 30 ng do produto de PCR (TcCla^{K184A}) contendo o sítio attB e 150 ng do plasmídeo pDONRTM22, 2 µl da enzima BP Clonase II em um volume final de 10 µl em TE. As reações foram incubadas a 25°C por 16 horas. Após essa etapa, foi adicionado 2 µg de proteinase K e a reação foi incubada por 10 min a 37°C. Em seguida esse material foi usado para transformar células cálcio-competentes (item 3.5) e os clones foram selecionados mediante técnica de palitagem descrita no item 3.6, sendo que o antibiótico usado para a seleção foi a canamicina. Tendo selecionado o clone contendo a inserção correta, foi feita a purificação dos plasmídeos conforme item 3.7.

3.16.3 Recombinação LR do gene da TcCla^{K184A} em vetor de destino pTcDD do sistema Gateway

Após a entrada do gene de interesse em pDONRTM221, foi feita recombinação LR para entrada no vetor de destino pTcDD (Figura 3.5). A reação foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway LR Clonase II Enzyme mix*, InvitrogenTM). Para o processo de recombinação foi usado 25 ng do clone de entrada contendo os sítios attL e 30 ng do vetor de destinação, 2 µl da enzima LR Clonase II e o volume final de 10 µl TE. As reações foram incubadas a 25°C por 16h e inativadas com 4 µg de proteinase K por 10 min a 37°C.

A recombinação LR foi utilizada para transformar células cálcio-competentes de *E. coli*. (item 3.5). Os clones foram selecionados mediante técnica de palitagem descrita no item 3.6. O antibiótico usado para a seleção foi a canamicina. Tendo selecionado o clone contendo a inserção correta, foi feita a purificação dos plasmídeos conforme item 3.7 e os clones seqüenciados (Macrogen, Seul, Coreia do Sul).

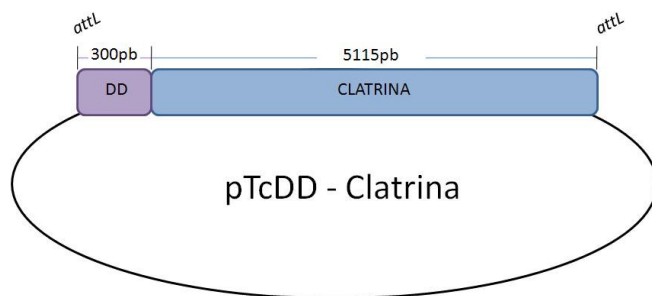


Figura 3.5. Esquema simplificado do vetor de destino pTcDD-Clatrina.

3.16.4 Transfecção do vetor pTcDD-Clatrina em *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até 2×10^7 células/ml. Os parasitas foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 min a 4°C . O sedimento celular foi lavado com PBS estéril e ressuspensão (1×10^8 células) em 1 ml de solução de eletroporação. Volumes correspondentes a 0,4 ml da suspensão de células foram transferidos para cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de GAP) (BioAgency) e pré-resfriadas. Em uma delas foram adicionados 40 μg do plasmídeo contendo TcCLA^{K184A} fusionado ao domínio de desestabilização. A outra cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas foi usada como controle. Após 10 min no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 Volts, 500 μF , utilizando o eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram incubadas novamente por 10 min no gelo e em seguida foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm^2 , contendo 10 ml de meio LIT (suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). As culturas foram então incubadas a 28°C . Após 24 horas de incubação adicionou-se o antibiótico G418 na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para a seleção dos parasitas transfectantes, as culturas foram mantidas até a ausência de proliferação celular na cultura controle.

3.16.5 Indução da estabilidade de expressão da TcCLA^{K184A}

Após a seleção dos parasitas transfectantes, foi feita uma análise para verificar a expressão de TcCLA^{K184A}. Assim a estabilidade da expressão da TcCLA^{K184A} foi induzida com rapamicina em uma cultura de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. A expressão da TcCLA^{K184A} foi analisada através de

Western blot em 24 horas, 48 horas e 72 horas após a adição da droga. A cultura não induzida com a droga foi utilizada como controle negativo da reação.

Além da produção de extratos para análise de *Western blot* foi feita também uma lamina para coloração dos parasitas e análise do fenótipo causado pela mutação, conforme protocolo descrito a seguir.

3.16.6 Coloração dos parasitas transfectantes

A coloração dos parasitas foi realizada pelo método Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) modificado. Os parasitas de interesse foram coletados por centrifugação de 1 min a 7.000 x g, lavados em PBS para remoção do meio de cultivo e ressuspensos em PBS. Desta suspensão uma aliquota foi retirada e depositada sobre lâminas previamente limpas. Quando secas as lâminas foram imersas, individualmente, na Solução 1 (Fixador), Solução 2 (Revelador) e Solução 3 (Corante), em cada uma por 20 segundos. Após este processo as lâminas foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e cobertas com Permount e lamínula. Os parasitas foram visualizados em microscópio Nikon E600.

3.17 IMUNOPRECIPITAÇÃO

A fim de avaliar a interação da cadeia pesada de clatrina com as proteínas AP β 2, AP μ 2 e cadeia leve de clatrina, procedemos à imunoprecipitação destas últimas proteínas com seus respectivos anticorpos. Inicialmente 20 μ l de soro de camundongo contendo os anticorpos específicos para cada proteína foram diluídos em 100 μ l de PBS e 1 mg/mL de BSA e incubados por 2 horas à temperatura ambiente com 50 μ l de resina de proteína G-sepharose cada, sob agitação. Após incubação foi realizada uma reação de *crosslinking* para ligar o anticorpo à proteína G covalentemente. Este procedimento é possível com a utilização do reagente dimethyl pimelimidate (DMP): a resina foi lavada por 5 min com PBS acrescido de 1 mg/ml de BSA, depois somente com PBS e, então, incubada por 30 min com 0,02 M de DMP diluído em 0,2 M de trietanolamina pH8.0, repetindo este processo 3 vezes, sempre lavando com 0,2 M de trietanolamina pH8.0 entre as incubações. A reação foi parada com 0,05 M de etanolamina pH 8.0 e a resina foi lavada 3 vezes com PBS.

Após o *crosslinking*, aproximadamente 1 mg de extrato protéico de epimastigotas de *T. cruzi* foi incubado com a resina por 16 horas a 4°C. A seguir, a resina foi lavada com tampão de lavagem de imunoafinidade e as proteínas ligadas foram eluídas com 50 µl de glicina 0,2 M pH 2,5 por 5 min, neutralizando-se o pH logo em seguida com a adição de 15 µl de Tris-HCl pH 9.0. O material eluído de cada imunoprecipitação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido da transferência para membrana de nitrocelulose para realização de *Western blot* utilizando anticorpos para a cadeia pesada de clatrina, possibilitando assim verificar a presença ou ausência da mesma nos imunoprecipitados.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PARA CLATRINA E SUBUNIDADES DO COMPLEXO ADAPTADOR AP2 EM *T. cruzi*

Um estudo anterior (Corrêa et al., 2007) detectou por ferramentas de bioinformática a presença dos genes da cadeia pesada de clatrina e de todas as 4 subunidades do complexo adaptador 2 (presente na membrana plasmática) no genoma do *T. cruzi*. Realizamos então uma nova busca no banco genômico de *T. cruzi* para confirmar tais dados e nossos resultados confirmaram a identificação desses genes (Materiais e Métodos, Tabela 1). Além disto, identificamos uma sequência codificante hipotética para a cadeia leve de clatrina. Uma comparação dos genes identificados em *T. cruzi* com aqueles presentes em *Leishmania major* demonstrou uma grande similaridade entre eles. Já os genes para o complexo adaptador 2 (AP2) não puderam ser identificados em *T. brucei* (Tabela 5).

TABELA 5 – PERCENTAGEM DE IDENTIDADE E SIMILARIDADE (ENTRE PARÊNTESIS) DE GENES DE *T. CRUZI* COMPARADOS COM OS PRESENTES EM OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS E EM HUMANOS

Gene	<i>T. brucei</i>	<i>L. major</i>	<i>H. sapiens</i>
Clatrina - Cadeia pesada	72 (86)	66 (83)	40 (62)
Clatrina - cadeia leve	---	37 (56)	32 (56)
Subunidades do Complexo Adaptador AP2 – Membrana plasmática			
Adaptina α_2	---	46 (65)	35 (54)
Adaptina β_2	---	62 (80)	40 (61)
Adaptina μ_2	---	45 (66)	36 (58)
Adaptina σ_2	---	66 (86)	53 (74)

4.2 OBTENÇÃO DE PROTEINAS RECOMBINANTES

Com base na sequência codificante de cada gene foi possível sintetizar os oligonucleotídeos necessários para a amplificação dos genes de escolha. A cada oligonucleotídeo foi adicionada uma sequência correspondente aos sítios de endonucleases de restrição, possibilitando a formação de extremidades coesivas entre o inserto e o vetor e permitindo assim a ligação entre eles. As características

dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados estão apresentadas na Tabela 2 (Materiais e Métodos). Para os genes que apresentavam tamanho maior que 2.000 pares de bases (pb) foi utilizado apenas um fragmento N-terminal para clonagem e obtenção dos anticorpos. Assim, o valor indicado na Tabela 2 indica o tamanho do fragmento que foi clonado.

A amplificação dos genes selecionados resultou em produtos com tamanho previsto na Tabela 2. Os produtos das amplificações foram purificados com fenol-clorofórmio e precipitados com etanol absoluto e acetato de sódio para eliminação dos iniciadores, resultando em uma banda correspondente ao gene de interesse fusionado aos sítios para as enzimas de restrição (Figura 4.1).

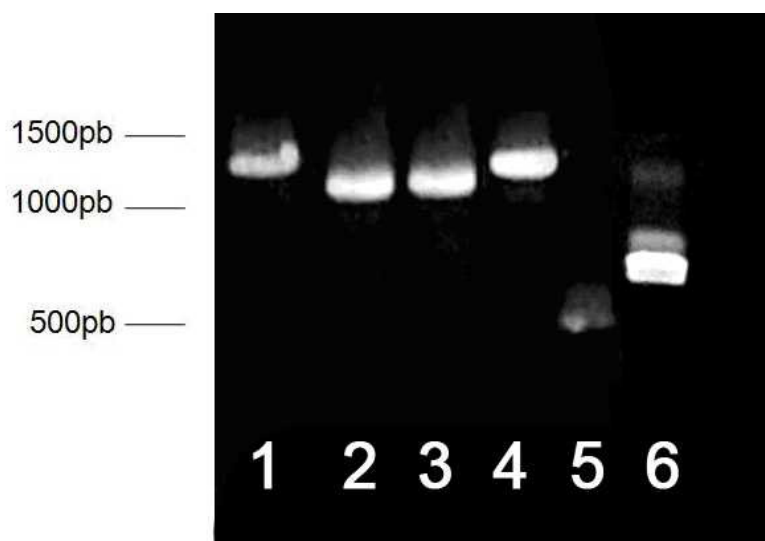


Figura 4.1. Amplificação dos genes de *T. cruzi*. Eletroforese em matriz de agarose 0,8%. 1- Cadeia pesada de clatrina (1360 pb); 2- Adaptina AP α 2 (1080 pb); 3- Adaptina AP β (1080 pb); 4- Adaptina AP μ 2 (1251 pb); 5- Adaptina AP σ 2 (432 pb); 6- Cadeia leve de clatrina (651 pb).

Depois de purificados e digeridos, os produtos de PCR foram clonados no vetor plasmidial pGEX-4T-1. A confirmação da inserção da sequência correspondente ao gene nos vetores foi feita pela técnica da palitagem e em seguida seqüenciados. Através deste ensaio foi verificado que a clonagem no vetor foi realizada com sucesso (Figura 4.2). Foi realizado o sequenciamento dos clones obtidos, que confirmou a correta inserção dos fragmentos nos vetores (dados não mostrados).

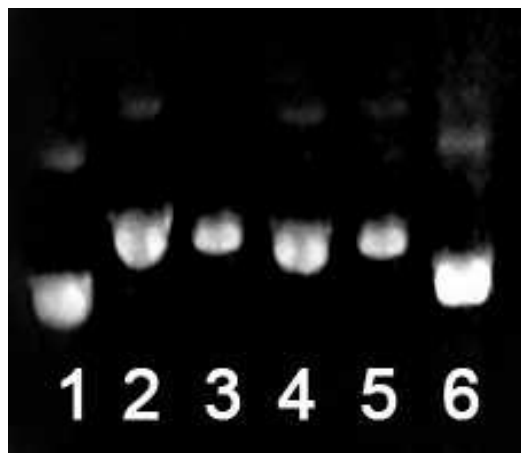


Figura 4.2. Clonagem dos genes no vetor pGEX-4T1. Eletroforese em matriz de agarose 0,8%. 1- Controle negativo pGex 4T-1; 2- Cadeia pesada de clatrina; 3- Adaptina AP α 2; 4- Adaptina AP β 2; 5- Adaptina AP μ 2; 6- Adaptina AP σ 2.

Os clones em pGEX-4T-1 foram expressos em *E.coli* Top10F' na fração insolúvel. O resultado da expressão foi confirmado por *Western blot* com anticorpos anti-GST, que reconhecem a etiqueta de GST fusionada à proteína recombinante (Figura 4.3). Todas as proteínas foram expressas no tamanho esperado.

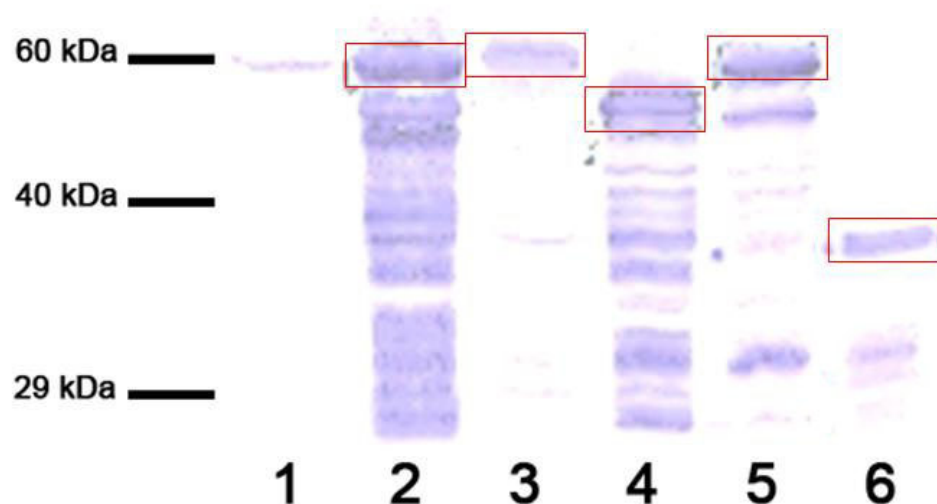


Figura 4.3. Expressão das proteínas recombinantes insolúveis, confirmada por *Western blot* anti-GST. 1- Controle não-induzido; 2- Cadeia pesada de clatrina; 3- Adaptina AP μ 2; 4- Adaptina AP β 2; 5- Cadeia leve de clatrina; 6- Adaptina AP σ 2. Todas as proteínas foram expressas no tamanho esperado. A expressão de cada proteína está indicada em vermelho.

Para purificação das proteínas e produção de anticorpos foram selecionadas as seguintes proteínas: cadeia pesada de clatrina, cadeia leve de clatrina e a subunidade AP β . Essas proteínas foram purificadas por eletroeluição a partir do gel de poliacrilamida. Os resultados obtidos permitiram purificar quantidade suficiente de cada proteína para a inoculação em camundongos. A purificação da cadeia pesada de clatrina é mostrada como exemplo na Figura 4.4.

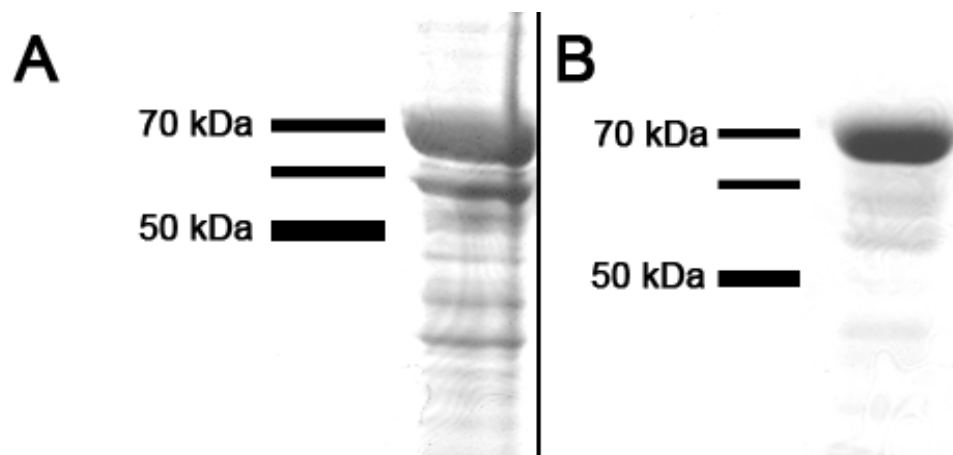


Figura 4.4. Expressão e Purificação da Cadeia Pesada de Clatrina. Perfil eletroforético da expressão (A) e purificação (B) da proteína recombinante (cadeia pesada de clatrina) em matriz de poliacrilamida 13%.

4.3 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Os polipeptídios recombinantes para as cadeias leve e pesada de clatrina, e da subunidade AP β do complexo adaptador AP2 de *T. cruzi* foram inoculados em camundongos Swiss em duplicata, permitindo assim a obtenção de anticorpos para estas proteínas. A especificidade destes anticorpos foi analisada por *Western blot*, usando extratos de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (Figuras 4.5, 4.6 e 4.8).

A análise dos anticorpos para a subunidade AP β reconheceu um polipeptídio de massa molecular compatível com o esperado (Figura 4.5).

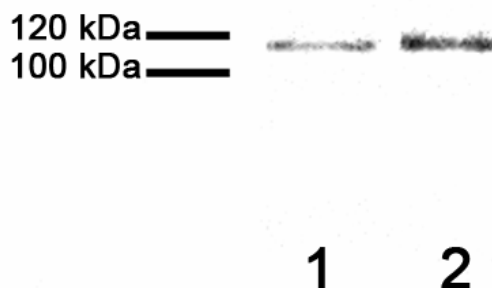


Figura 4.5. Análise da produção de anticorpos para a subunidade AP β . O anticorpo para subunidade AP β foi produzido como esperado (massa molecular = 106 kDa). 1- Formas epimastigotas de *T. cruzi*. 2- Formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*.

A análise do antisoro para a cadeia pesada de clatrina (TcClatrina) mostrou que este reconheceu um polipeptídeo de massa molecular compatível com aquela deduzida a partir da seqüência do gene da cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* (192 kDa, dados não mostrados).

Este antisoro foi utilizado em ensaios do tipo *Western blot* para analisar a expressão desta proteína nas diferentes fases da metaciclogênese de *T. cruzi*, assim como em outros tripanosomatídeos. Um polipeptídeo de aproximadamente 192 kDa foi reconhecido em extratos de todas as formas de *T. cruzi* analisadas durante o processo de diferenciação (metaciclogênese) do parasita (Figura 4.6).

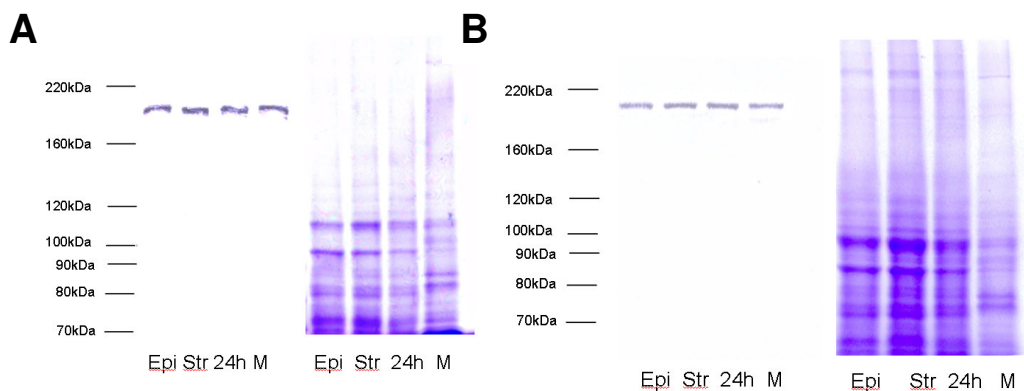


Figura 4.6. Análise por Western blot da expressão da cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* (TcClatrina) durante o processo de metaciclogênese. As posições das bandas do marcador de massa molecular em kDa estão indicadas à esquerda. (A) Perfil de expressão usando 15 μ g de proteína em cada poço; ao lado direito está o perfil eletroforético correspondente. (B) Perfil de expressão usando para a análise $1,0 \times 10^7$ parasitas em cada poço; ao lado direito está o perfil

eletroforético correspondente. **Epi**- formas epimastigotas de cultura em meio LIT; **Str**- formas epimastigotas em stresse nutricional em meio TAU; **24h**- formas epimastigotas após 24 horas de diferenciação em meio TAU3AAG; **M**- formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Pode-se observar que a proteína TcClatrina é expressa em todas as fases analisadas.

O soro anti-TcClatrina também foi reagido com extratos de diferentes tripanosomatídeos. A reação positiva para todos os parasitas analisados, em uma banda de aproximadamente 192 kDa, demonstrou que a porção globular da proteína é conservada nesses tripanosomatídeos, sendo expressa em diferentes espécies (Figura 4.7). Entretanto, em *Crithidia deanei* e em *Phytomonas serpens* duas bandas foram detectadas, sendo uma de massa molecular esperada (~192 kDa) e outra de massa molecular menor, de aproximadamente 120 kDa.

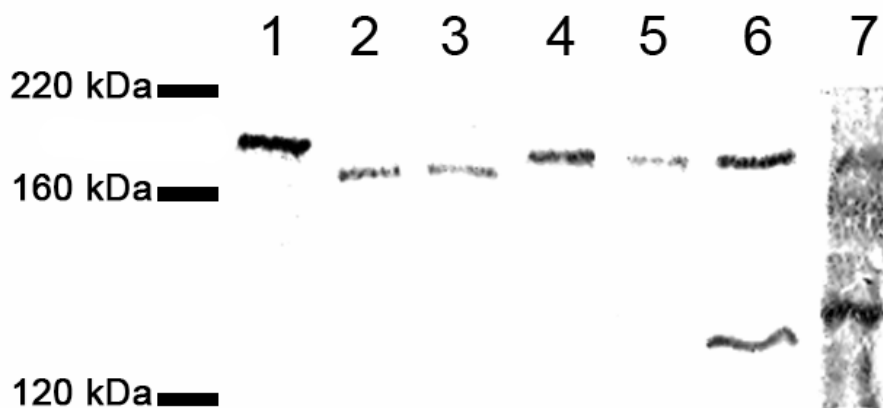


Figura 4.7. Análise da expressão da TcClatrina em diferentes tripanosomatídeos por meio de Western blot. 1- formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*; 2- formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*; 3; formas promastigotas de *Leishmania major*; 4- formas epimastigotas de *Blastocrithidia culicis*; 5- formas coanomastigotas de *Crithidia fasciculata*; 6- formas coanomastigotas de *Crithidia deanei* com bactéria endossimbionte; 7- formas promastigotas de *Phytomonas serpens*. As colunas 1-7 contém o correspondente a 10^7 células.

A análise do antisoro para a cadeia leve de clatrina (TcCLC) mostrou que este reconheceu um polipeptídeo de massa molecular não compatível (~60 kDa) com aquela deduzida a partir da sequência do gene da cadeia leve de clatrina de *T. cruzi* (26 kDa, dados não mostrados).

Mesmo assim este antisoro também foi testado para *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos. Foi obtida reação positiva em todas as amostras testadas, reconhecendo um polipeptídio de aproximadamente 60 kDa (Figura 4.8).

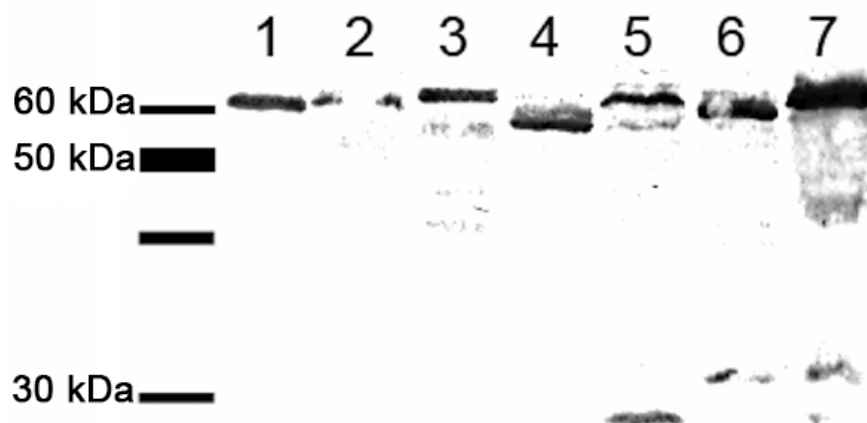


Figura 4.8. Análise da expressão da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes tripanosomatídeos por meio de Western blot. 1- formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*; 2- formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*; 3- formas promastigotas de *Leishmania major*; 4- formas epimastigotas de *Blastocrithidia culicis*; 5- formas coanomastigotas de *Crithidia fasciculata*; 6- formas coanomastigotas de *Crithidia deanei* com bactéria endossimbionte; 7- formas promastigotas de *Phytomonas serpens*. As colunas 1-7 contêm o correspondente a 10^7 células.

4.4 LOCALIZAÇÃO CELULAR

Foram realizados ensaios de localização celular por imunofluorescência com os anticorpos obtidos para cadeia pesada de clatrina, cadeia leve de clatrina e a subunidade adaptadora AP β . O ensaio com o anticorpo pré-imune (soro retirado do camundongo antes das inoculações) também foi realizado, sendo que com este não se obteve marcação, como esperado (Dados não mostrados).

Os resultados com a cadeia pesada da clatrina (TcClatrina) em *T. cruzi* mostraram a localização da proteína na região anterior ao cinetoplasto em formas epimastigotas, compatível com a região da bolsa flagelar, enquanto em formas tripomastigotas reação positiva foi encontrada em uma região compatível com a localização do complexo de Golgi (entre o cinetoplasto e o núcleo, porém mais próximo ao núcleo). A localização da clatrina em formas amastigotas não foi

conclusiva, havendo uma reação positiva dispersa por todo o citoplasma destas formas, seja intracelulares ou extracelulares (Figura 4.9).

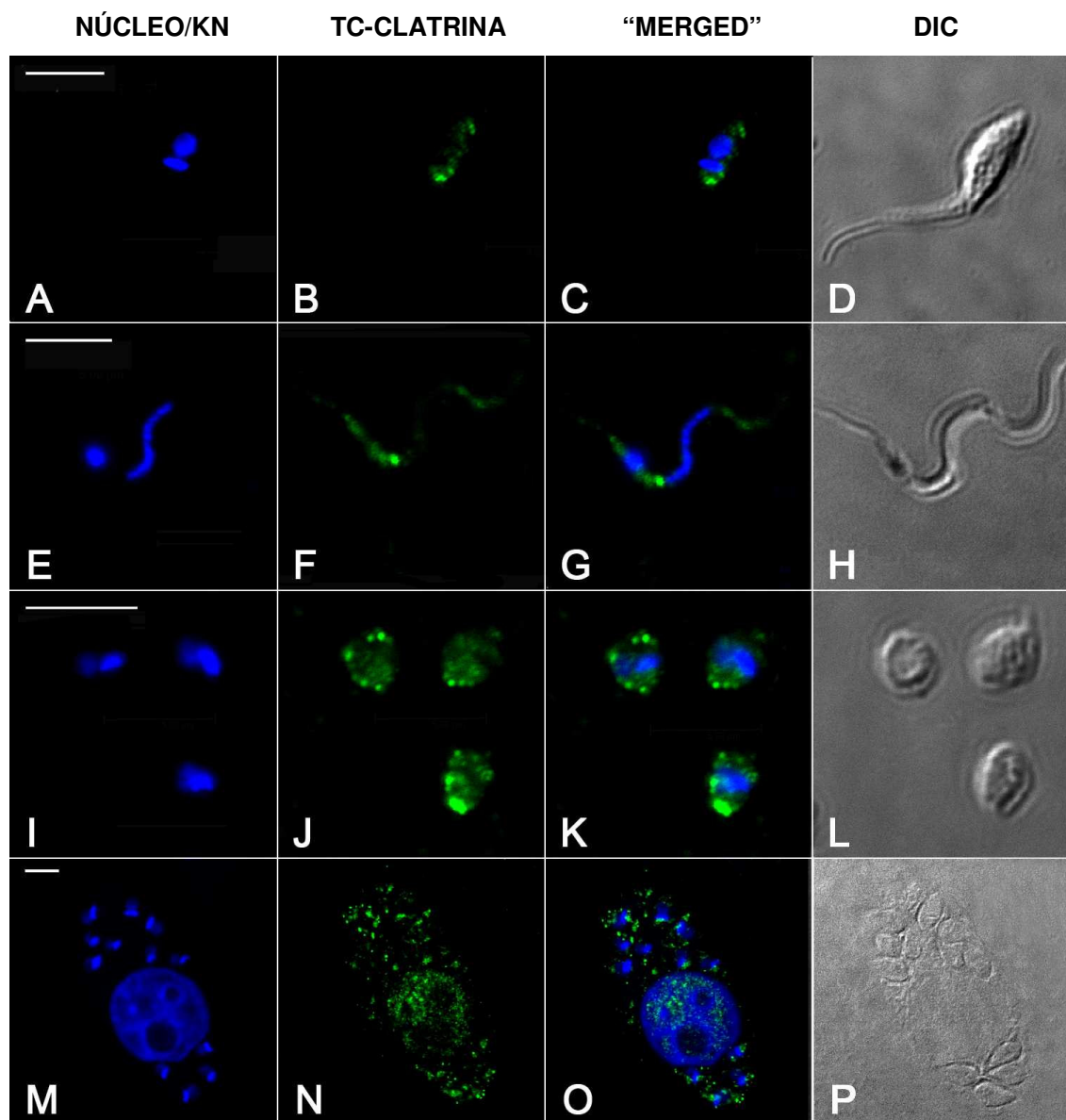


Figura 4.9. Localização da cadeia pesada de clatrina (TcClatrina) em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* por microscopia confocal a laser. (A-D)- Formas epimastigotas. (E-H): formas tripomastigotas. (I-L)- Formas amastigotas extracelulares. (M-P)- Formas amastigotas intracelulares. A,E,I,M- marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto (KN) com Hoechst 33342; B,F,J,N- detecção da TcClatrina usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. C,G,K,O- Sobreposição das imagens de Hoechst e TcClatrina (Merged). D,H,L,P- Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC). Barra = 5 μ m.

O antisoro da TcClatrina também foi reagido com *Crithidia deanei* com simbiote, *Crithidia fasciculata* e *Phytomonas serpens*. Nestes parasitas a reação positiva para a cadeia pesada da clatrina se localizou na região da bolsa flagelar (Figura 4.10).

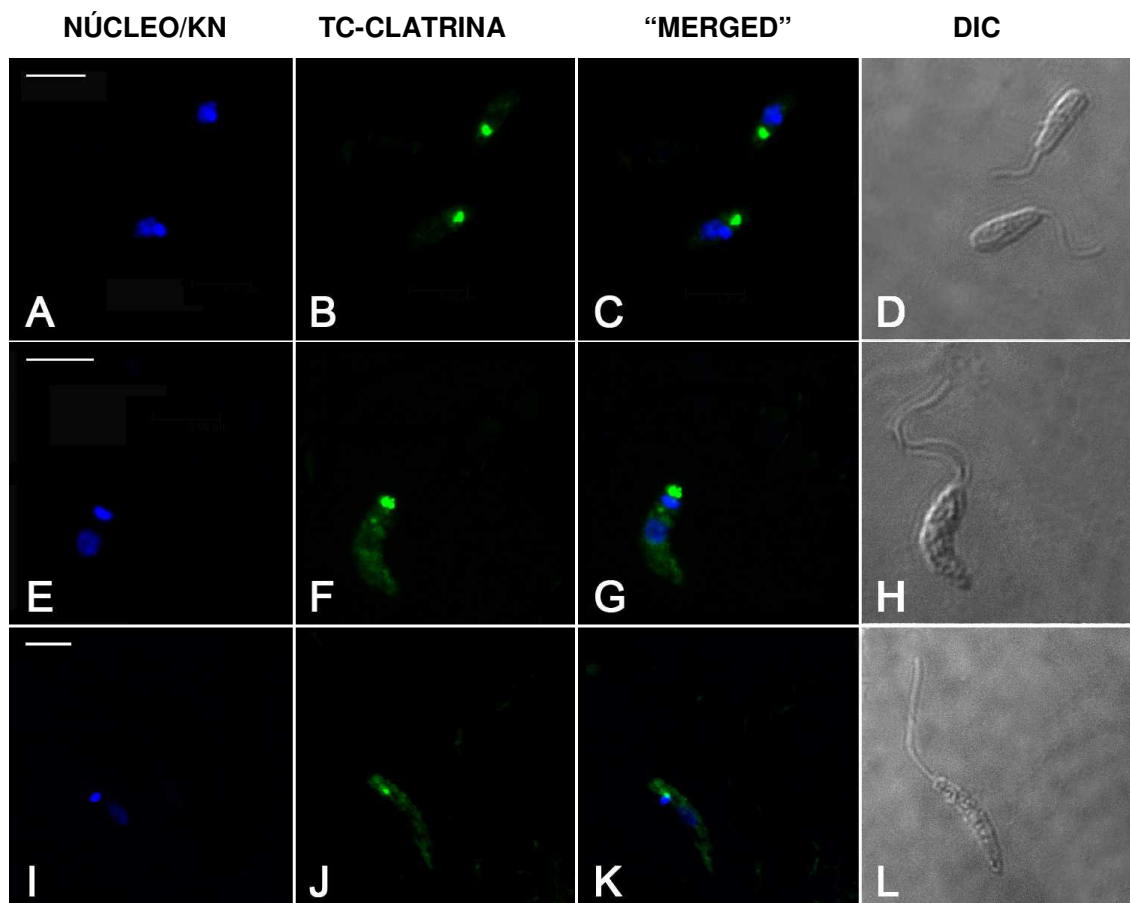


Figura 4.10. Localização da TcClatrina em diferentes tripanosomatídeos por microscopia confocal a laser. (A-D)- *Crithidia deanei* com simbiote. (E-H)- *Phytomonas serpens*. (I-L)- *Crithidia fasciculata*. A,E,I- marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto (KN) com Hoechst 33342. B,F,J- detecção da TcClatrina usando um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. C,G,K- Sobreposição das imagens de Hoechst e TcClatrina. D,H,L- Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC). Barra = 5 μ m.

Foram obtidos resultados similares quando foi realizada a localização da cadeia leve da clatrina. Os resultados em *T. cruzi* (Figura 4.11) mostraram localização desta proteína na região da bolsa flagelar de formas epimastigotas e amastigotas, e localização na região de bolsa flagelar e de complexo de Golgi de formas tripomastigotas (isto é, ao lado da bolsa flagelar, mas próximo ao núcleo).

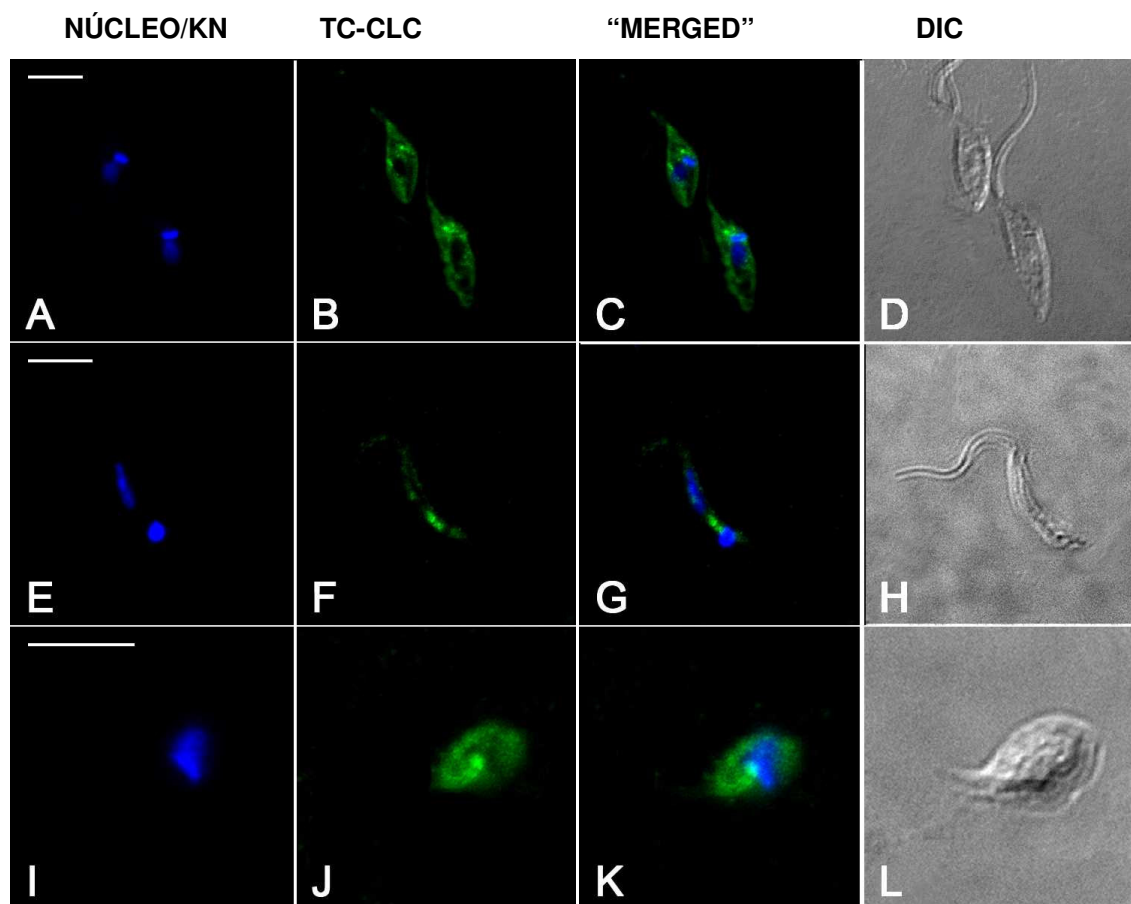


Figura 4.11. Localização da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* por microscopia confocal a laser. (A-D)- formas epimastigotas. (E-H)- formas tripomastigotas. (I-L)- formas amastigotas. A,E,I- marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto (KN) com Hoechst 33342. B,F,J- Detecção da cadeia leve de clatrina usando um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488. C,G,K- Sobreposição das imagens de Hoechst e TcCLC (Merged). D,H,L- Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC). Barra = 5 µm.

Em outros tripanosomatídeos como *Crithidia deanei* com simbiote, *Crithidia fasciculata*, *Blastocrithidia culicis* e *Phytomonas serpens* a marcação para a cadeia leve de clatrina (TcCLC) apresentou uma localização majoritária em uma região correspondente ao complexo de Golgi, ao lado do cinetoplasto (Figura 4.12).

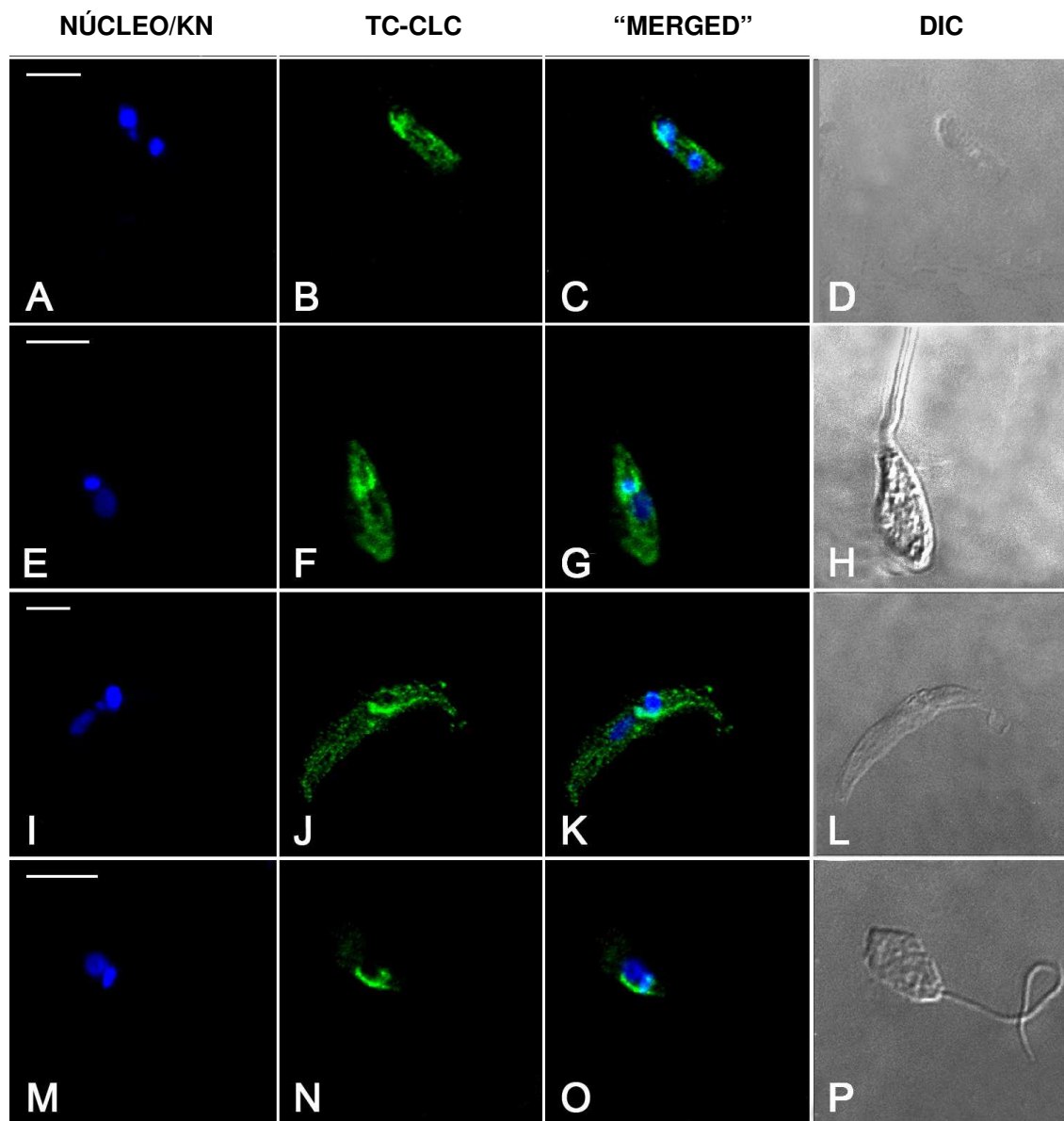


Figura 4.12. Localização da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes tripanosomatídeos por microscopia confocal a laser. (A-D)- *Crithidia deanei* com simbiote. (E-H)- *Crithidia fasciculata*. (I-L)- *Blastocrithidia culicis*. (M-P)- *Phytomonas serpens*. A,E,I,M- marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto (KN) com Hoechst 33342. B,F,J,N- detecção da cadeia leve de clatrina usando um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488. C,G,K,O- Sobreposição das imagens de Hoechst e TcCLC (Merged). D,H,L,P- Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC). Barra = 5 μ m.

Os resultados para a subunidades AP β (Figura 4.13) do complexo adaptador em formas epimastigotas de *T. cruzi* mostraram uma marcação nuclear que não era esperada. Por outro lado, em formas tripomastigotas houve reação positiva na região da bolsa flagelar (Figuras 4.13).

Assim, o soro para a subunidade AP β foi reagido com formas procíclicas de *T. brucei*. Neste parasita foi observada ausência de marcação nuclear, havendo uma reação mais intensa na região entre o núcleo e o cinetoplasto (Figuras 4.13).

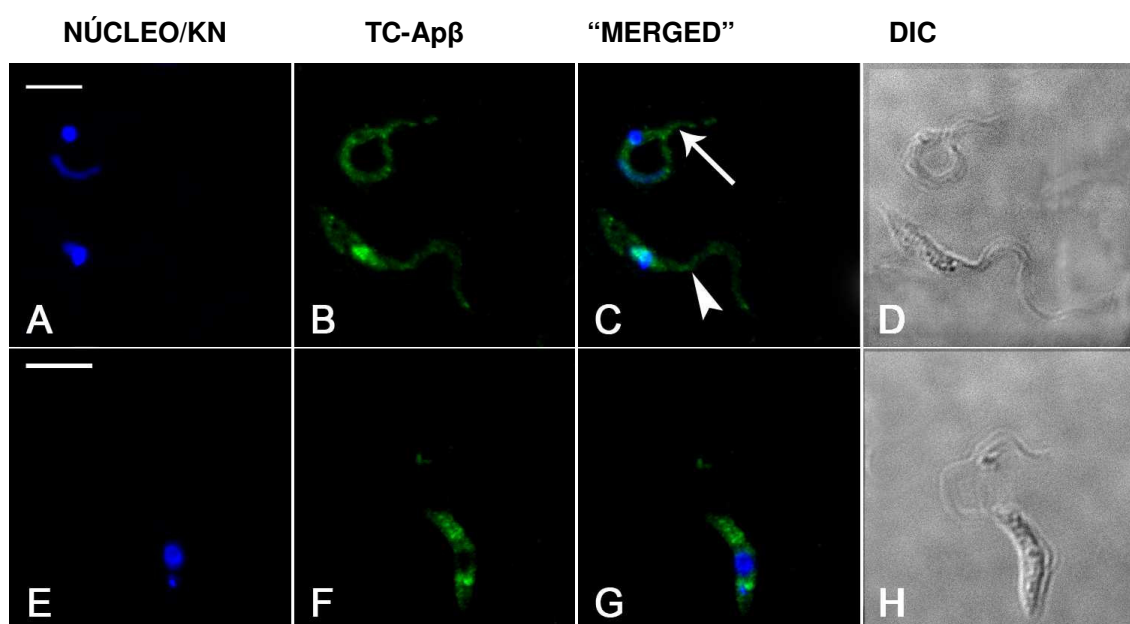


Figura 4.13. Localização da Tc-AP β em *T. cruzi* e *T. brucei* por microscopia confocal a laser. (A-D)- Forma tripomastigota (seta) e epimastigota (cabeça de seta) de *T. cruzi*. (E-H)- Forma procíclica de *T. brucei*. (A,E)- marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto (KN) com Hoechst 33342. (B,F)- Detecção da Tc-AP β usando um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488. (C,G)- Sobreposição das imagens de Hoechst e Tc-AP β (Merged). (D,H)- Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC). Barra = 5 μ m.

A imunolocalização da cadeia pesada de clatrina também foi investigada em formas epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão, usando anticorpos secundários acoplados a partículas de ouro coloidal de 10 nm de diâmetro. Reação positiva foi encontrada na membrana da bolsa flagelar (Figura 4.14).

Para verificar se em *T. cruzi* transferrina e albumina são endocitadas em um mecanismo dependente de clatrina, a imunolocalização foi realizada em formas epimastigotas após endocitose de moléculas de albumina complexadas a ouro coloidal de 60 nm e transferrina acoplada a ouro coloidal de 15 nm. Observou-se que albumina e transferrina são endocitadas majoritariamente pelo complexo citóstoma/citofaringe, não sendo observada reação para clatrina na membrana desta estrutura. Por outro lado, a cadeia pesada da clatrina foi localizada exclusivamente associada à membrana da bolsa flagelar (Figura 4.14 3,4).

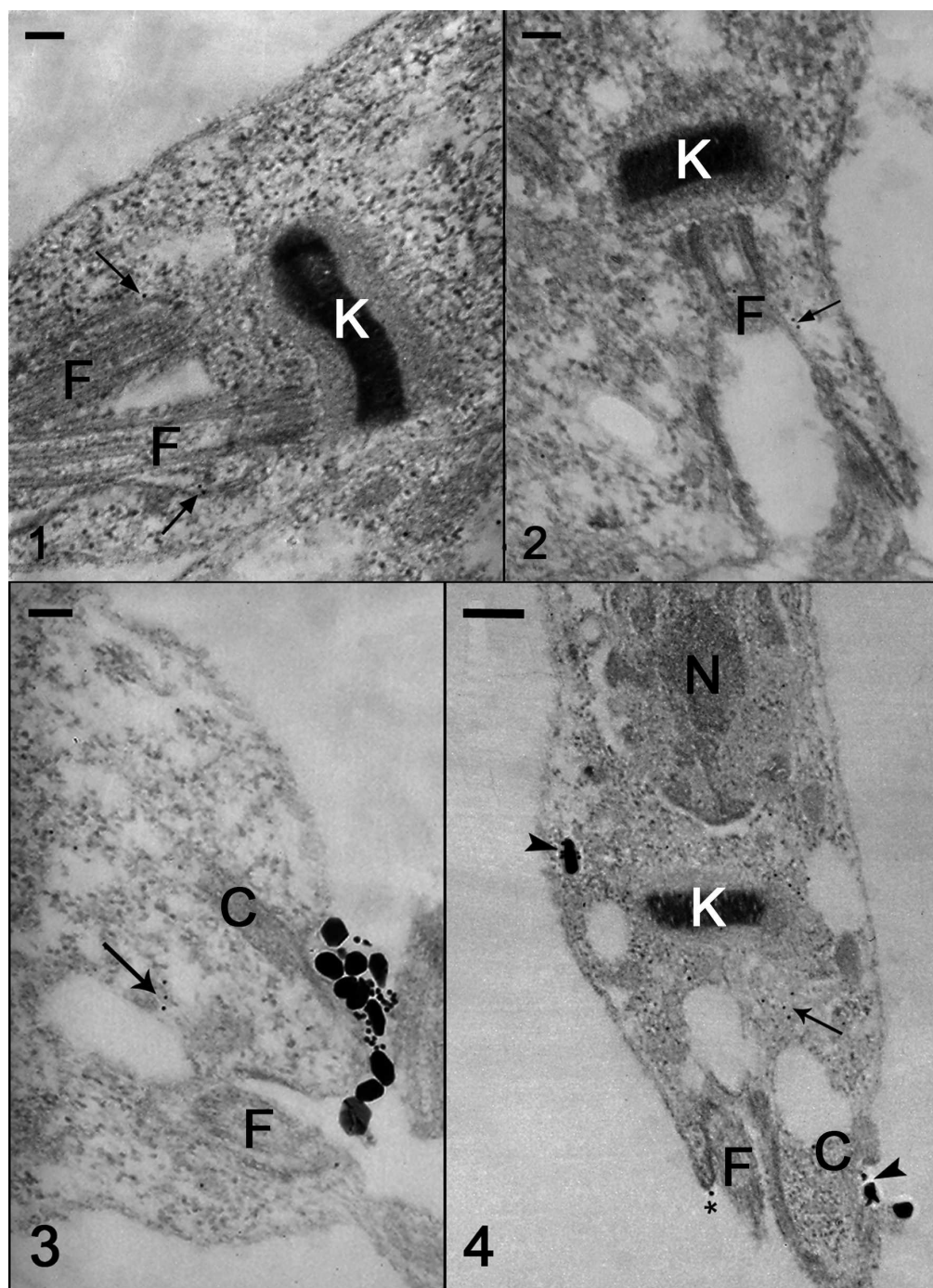


Figura 4.14 Imunolocalização da cadeia pesada da clatrina em formas epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão. (1,2,3,4) A proteína clatrina (seta) foi localizada associada à membrana da bolsa flagelar. (3,4) – Em epimastigotas pré-incubados com Albumina-Au 60 nm (cabeça de seta) e transferrina-Au 15 nm (asterisco) e em seguida processados para imunolocalização de clatrina utilizando partículas de ouro de 10 nm (seta). Observa-se que os traçadores são ingeridos preferencialmente pelo complexo citóstoma/citofaringe (C). F = Flagelo, N = Núcleo, K = Cinetoplasto. Barra = 100 nm.

A imunolocalização da cadeia leve de clatrina também foi investigada em formas epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com os resultados obtidos com a cadeia pesada de clatrina, reação positiva também foi encontrada associada à membrana da bolsa flagelar. Não foi encontrada marcação associada ao complexo citóstoma/citofaringe (Figura 4.15).

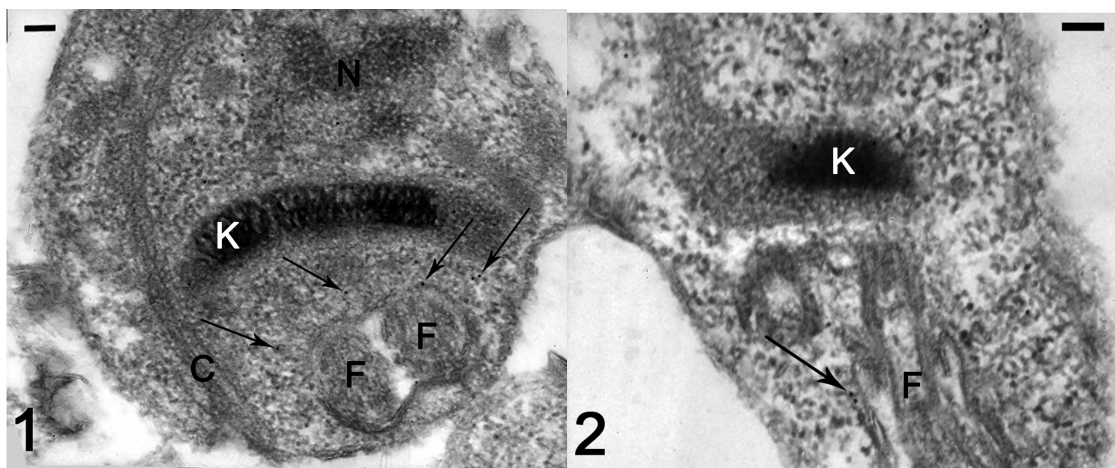


Figura 4.15. Imunolocalização da cadeia leve da clatrina em formas epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão. (1,2) A proteína foi localizada associada à membrana da bolsa flagelar (seta). K = cinetoplasto, F = flagelo, N = núcleo, C = citóstoma. Barra = 100 nm

4.5 DOMINANTE NEGATIVO

Foi desenvolvido recentemente (Massaki e colaboradores, em preparação) um vetor (pTcDD) que proporciona a fusão do gene de interesse com um domínio desestabilizador (ddFKBP). Esse domínio desestabilizador proporciona a degradação da proteína à qual está fusionado. A estabilização seletiva da proteína é alcançada pela ligação reversível de um ligante sintético, denominado Shield-1, ao domínio de desestabilização (ddFKBP) fusionado à proteína de interesse. Assim, a proteína não é levada à degradação. O ligante sintético pode ser substituído pela rapamicina, a qual tem baixo custo e é atóxica.

Para isso, a amplificação do gene $TcCla^{K184A}$ por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feita em duas fases. Primeiro foram utilizados dois conjuntos de primers (K184AF + ddCLAR e ddCLAF + K184AR), gerando dois fragmentos de 4572 pb e 560 pb, respectivamente (Figura 4.16A), seguido da fusão dos dois

fragmentos. Após a fusão dos dois fragmentos, foi feita nova PCR, gerando a sequência da clatrina mutante TcCla^{K184A} (Fig 4.16B). Este fragmento foi clonado no vetor pTcDD e sequenciado, a fim de verificar a correta inserção do fragmento no vetor, bem como a presença da mutação.

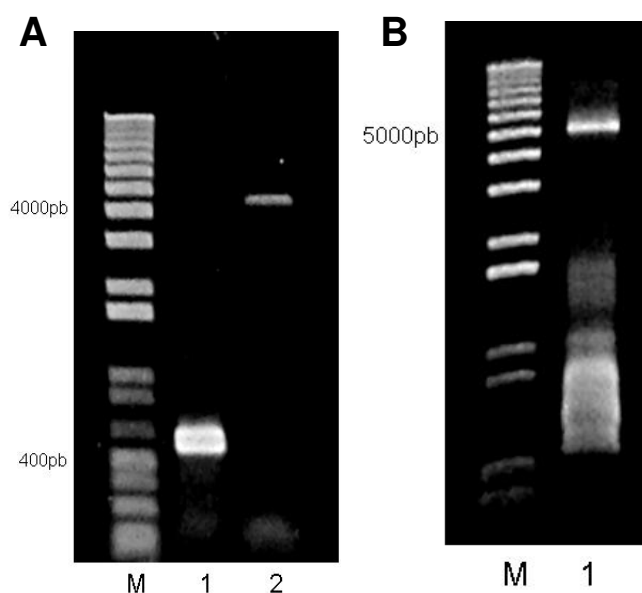


Figura 4.16. Amplificação por PCR do gene TcCla^{K184A} em duas fases. Em A: 1 = fragmento de 560 pb e 2 = fragmento de 4572 pb. Em B: Amplificação dos 2 fragmentos fusionados. M = marcador de massa molecular.

Este clone foi transfectado em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foram produzidos extratos 24, 48 e 72 horas após a indução com rapamicina da estabilização da expressão da proteína contendo a mutação. Essa técnica permitiu a obtenção de parasitas contendo TcCla^{K184A} (TcClatrina dominante negativo) e esse resultado foi verificado mediante ensaio de *Western blot* (Figura 4.17A).

Visualização dos parasitas contendo a clatrina mutada por microscopia ótica (vivos ou corados) não permitiu observar nenhum fenótipo alterado relevante (Figura 4.17B), provavelmente devido ao fato de que há muito mais proteína nativa do que a proteína mutada, não sendo assim possível a geração de um fenótipo alterado relevante.

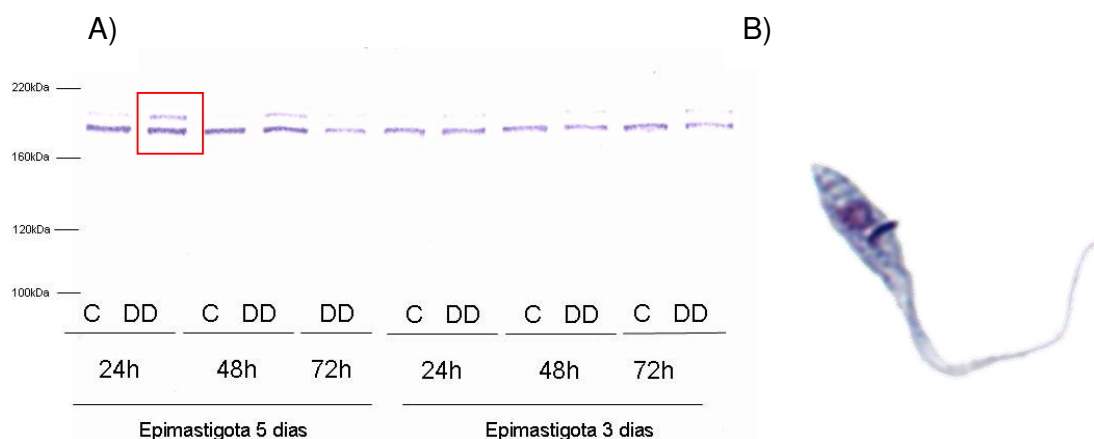


Figura 4.17. A) Western blot para verificar a presença da TcCla^{k184A} fusionada ao domínio-DD (genótipo TcClatrina dominante negativo). Nesse ensaio foi possível observar uma banda correspondente à cadeia pesada de clatrina nativa, e uma segunda banda cerca de 12 kDa acima correspondente à cadeia pesada de clatrina fusionada ao domínio-DD (TcCla^{k184A}). O melhor resultado foi obtido com 24 horas de indução com rapamicina, indicado em vermelho. C = Controle negativo, sem indução com rapamicina. DD = Induzido com rapamicina. **B) Visualização de forma epimastigota contendo o gene TcCla^{k184A} após 24 horas de indução com rapamicina, mediante coloração com Panótico Rápido.**

6.2 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os resultados mostram a interação ou não da cadeia leve de clatrina (Tc-CLC) e da subunidade AP β com a cadeia pesada de clatrina. A banda correspondente à cadeia pesada de clatrina foi visualizada, através de *Western blot*, nos imunoprecitados (eluído e/ou resina) de AP β e Tc-CLC, indicando que ambas apresentaram interação com a cadeia pesada de clatrina.

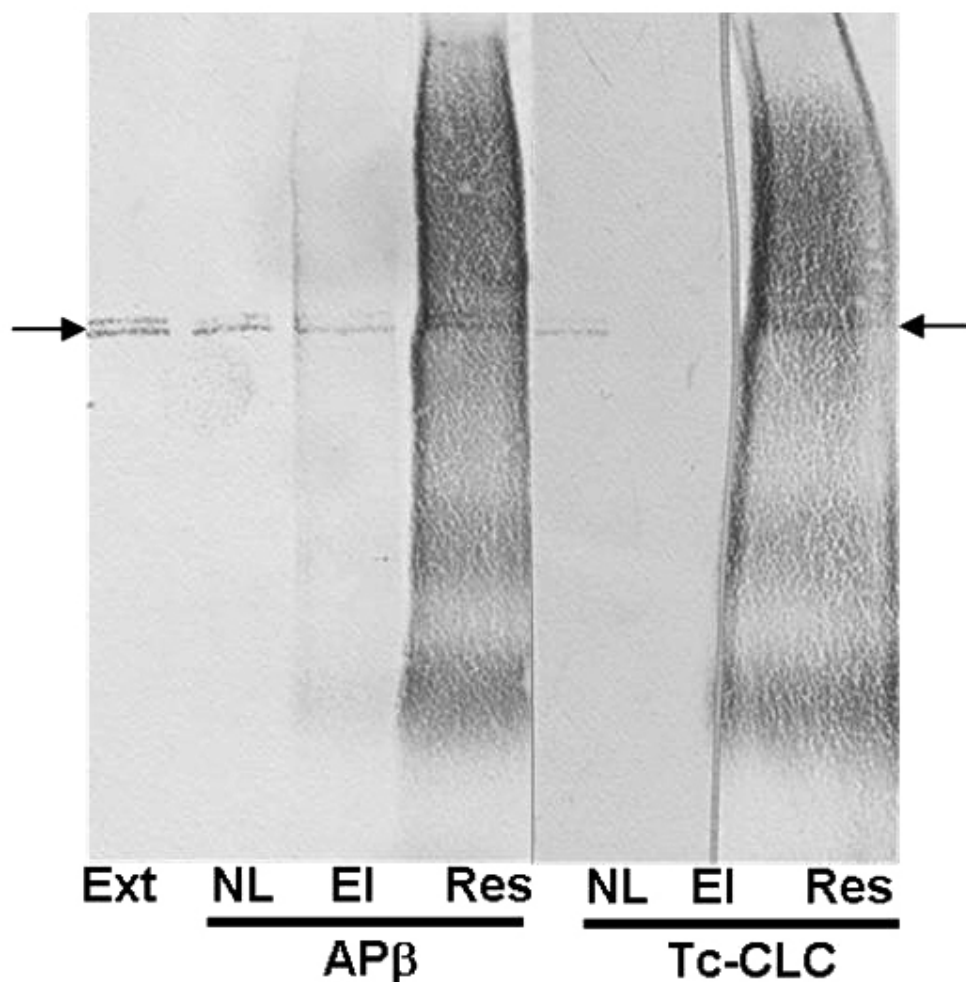


Figura 4.18 Imunoprecipitação das proteínas AP β e da cadeia leve de clatrina com a cadeia pesada de clatrina. Extrato total de *T. cruzi* (Ext, controle positivo), NL = Não-ligado, EI = Eluído e Res = Resina. A flecha corresponde ao reconhecimento do antisoro TcClatrina.

5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE GÊNICA

Muitos processos celulares dependem da regulação da polimerização espontânea de proteínas em estruturas macromoleculares. Tais reações de autopolimerização incluem a polimerização de elementos do citoesqueleto (Egelman e Orlova, 1995), a oligomerização de fatores de transcrição (Wu, 1995) e a montagem de vesículas revestidas com clatrina em membranas (Pearse e Crowther, 1987). A clatrina é uma proteína estrutural que forma um revestimento em vesículas que brotam a partir da membrana plasmática (endocitose) e a partir da membrana da Rede Trans Golgi (vesículas carreadoras de enzimas lisosomais, que serão direcionadas aos endossomos tardios). Este revestimento é essencial para o brotamento das vesículas. Entretanto, para se ligar às membranas, as moléculas de clatrina necessitam do auxílio de complexos adaptadores (APs), os quais fazem uma ponte entre a rede de clatrina por um lado e a porção citoplasmática de moléculas de receptores de membrana por outro lado. A formação da estrutura poliédrica da clatrina ocorre espontaneamente *in vitro* em pH 6,5, mas no pH fisiológico só haverá formação do revestimento de clatrina na presença de quantidades estequiométricas de moléculas dos complexos adaptadores AP1 ou AP2 (Brodsky, 1988). O complexo AP1 se localiza na Rede Trans Golgi, enquanto o complexo AP2 se localiza na membrana plasmática.

Nesta dissertação tivemos como objetivo analisar a expressão e localização de clatrina e da subunidade AP β , relacionados ao processo de endocitose, em diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*, assim como em diversos outros tripanosomatídeos. A endocitose é um processo celular fundamental, e em tripanosomatídeos está envolvida na ingestão de nutrientes e na reciclagem e “down-regulation” de receptores de superfície (Morgan et al., 2002). A análise do genoma do *T. cruzi* já permitiu identificar neste protozoário a presença de conjuntos completos de genes codificantes para todas as subunidades dos complexos adaptadores (AP) 1-4 (Denny et al., 2005), bem como do gene que corresponde à cadeia pesada de clatrina (Corrêa et al., 2007; Denny et al., 2005). Em nosso trabalho confirmamos as identificações anteriores, garantindo assim a confiabilidade dos resultados.

A sequência nucleotídica da cadeia pesada de clatrina é altamente conservada entre as espécies, com a maioria das variações provenientes de substituições conservadoras, geralmente com menos de três resíduos de aminoácidos. A forte pressão para preservar a estrutura primária provavelmente reflete os contatos necessários para a montagem do esqueleto de revestimento, bem como o grande número de interações com outras proteínas envolvidas na triagem da carga e de regulação da formação do revestimento (Kirchhausen, 2000). A sequência nucleotídica da cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* indica a expressão de uma proteína bastante similar à clatrina humana (identidade = 40%; similaridade = 62%), contendo todos os domínios necessários para o seu funcionamento (Figura 5.1).

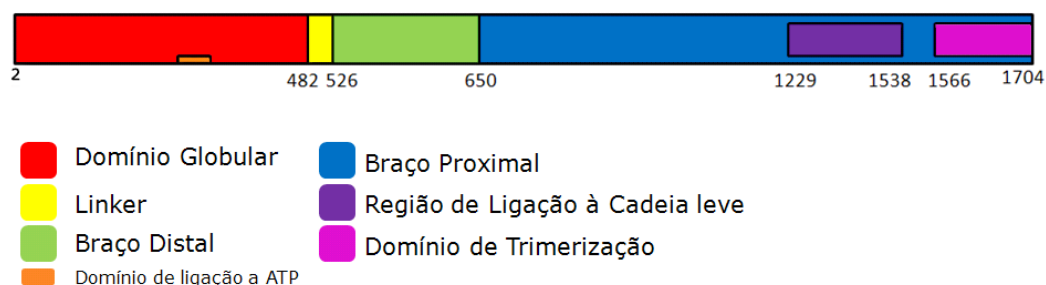


Figura 5.1. Domínios estruturais da cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* (TcClatrina). Os domínios são retratados com base na similaridade com a cadeia pesada de clatrina humana (acesso Q00610). Em vermelho (2-482): cabeça globular. Em amarelo (482-526): linker flexível. Em verde (526-650): braço distal. Em azul (650-1704): braço proximal. Em roxo (1229-1538): região de ligação da cadeia leve. Em rosa (1566-1704): região de trimerização. Em laranja: domínio de ligação a ATP.

A sequência nucleotídica da cadeia leve de clatrina não é tão conservada entre as espécies quanto a da cadeia pesada. A maioria dos tecidos de mamíferos expressa duas cadeias leves de clatrina distintas (LCa e LCb), mas relacionadas (Brodsky et al., 2001). Leveduras expressam apenas uma cadeia leve. Possivelmente devido a esta baixa conservação, a sequência nucleotídica da cadeia leve de clatrina em *T. cruzi* (TcCLC) não é claramente definida em bancos de dados. A busca de homologia entre sequências de aminoácidos de diversos organismos nos permitiu identificar o gene ID: Tc00.1047053506211.240 que codifica a provável

cadeia leve de clatrina. Este gene apresenta 32% de identidade e 56% de similaridade com a cadeia leve de clatrina (isoforma A) de *Homo sapiens*.

Para entender a regulação da polimerização da cadeia pesada de clatrina no meio intracelular, é necessário analisar as interações que ocorrem em seu domínio de trimerização, que compreende o local de ligação à cadeia leve. Foi proposto que a montagem do esqueleto de clatrina no meio intracelular é controlada aparentemente pela ligação da cadeia leve, que impede que o trisquélion de cadeia pesada seja montado espontaneamente e de forma não desejada no pH fisiológico (Ybe et al., 1999). Essa inibição seria dependente de 3 resíduos de aminoácidos ácidos na cadeia leve de clatrina. A hipótese é que os resíduos de aminoácidos 22-25 (GEED) da cadeia leve compreendem um sítio que opera o controle do pH, devido à conservação de cargas negativas. Assim, a ligação com a cadeia leve de clatrina evita a montagem espontânea do trisquélion, fazendo assim o processo de montagem e ancoramento à membrana ser dependente do Complexo Adaptador e de proteínas acessórias (Ybe et al, 1998). Na proteína de cadeia leve de clatrina de *T. cruzi* nós observamos a presença de uma seqüência WDNE nos resíduos 21-24 que poderia conter um provável local de controle operacional do pH. Para confirmar esses dados, pretendemos realizar ensaios de mutagênese nestes resíduos para observar o fenótipo gerado em *T. cruzi*.

Ybe (1998) comparou as seqüências da cadeia pesada de clatrina de oito organismos (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoidum*, *Glycine max* e *Saccharomyces cerevisiae*) a fim de observar seqüências que tivessem relação com a ligação da cadeia leve. Nesse estudo ele observou seqüências conservadas de resíduos de aminoácidos ácidos e básicos nas 8 espécies estudadas, nas posições equivalentes a DD (1132 e 1133) e RKKAR (1161–1165). Em *T. cruzi* encontramos um motivo KD nas posições equivalentes a 1132 e 1133 (DD), enquanto nas posições equivalentes a RKKAR encontramos um motivo RKESRAR. Assim, neste último caso observamos uma inserção de dois resíduos (ES).

Três histidinas, nas posições 1279, 1313 e 1335 da cadeia pesada de clatrina bovina estão presentes em posições equivalentes em sete das oito espécies estudadas por Ybe (1998), enquanto as histidinas nas posições 1313 e 1335 estão presentes nas oito espécies em posições equivalentes. O estudo de Ybe (1998)

propõe que essas histidinas, nessas posições, participam na polimerização da clatrina. Em *T. cruzi* as histidinas nas posições equivalentes a 1313 e 1335 também estão presentes.

No domínio de trimerização da cadeia pesada de clatrina esses resíduos ácidos e básicos conservados são orientados de forma anti-paralela e interagem entre si, proporcionando a auto-polimerização do trisquélion. A cadeia leve de clatrina se insere entre esses sítios com cargas opostas (em bovino GEED e em *T. cruzi* WDNE) e impede a montagem espontânea da cadeia pesada, fazendo com que, in vivo, a montagem seja dependente das proteínas adaptadoras (Liu et al., 1995). Segundo este modelo, os adaptadores introduzem seqüências polipeptídicas que revertem os efeitos da cadeia leve e são sugeridos dois possíveis mecanismos com os quais os adaptadores podem controlar a montagem do revestimento de clatrina. Em um deles, os adaptadores podem eles mesmos ter resíduos com cargas positivas que interagem com seqüências regulatórias da cadeia leve e assim liberam as cadeias pesadas para proporcionar a trimerização destas cadeias. Alternativamente, os adaptadores podem se alinhar no domínio distal ou terminal do trisquélion com o segmento *linker* para prover a competição dos resíduos necessários a fim de reverter a inibição promovida pela cadeia leve (Liu et al., 1995)

Dados de Ybe et al. (2003) demonstraram a contribuição de resíduos de cisteínas para estabilização do domínio de trimerização da clatrina. Estes resíduos estão presentes nas posições 1565, 1569 e 1573 na cadeia pesada de clatrina humana e de camundongo. Quando comparamos as seqüência gênicas da cadeia pesada de clatrina de diferentes tripanosomatídeos com as descritas por Ybe et al., (2003) foi possível demonstrar que estas cisteínas também estão presentes em posições equivalentes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (Figura 5.2).

<i>T. cruzi</i>	...	V	V	D	H	P	-	E	C	F	V	A	C	L	Y	T	C	Y	D	Y	L	T	...
<i>T. brucei</i>	...	A	V	E	R	P	-	D	S	F	V	S	C	L	Y	A	C	Y	D	Y	L	S	...
<i>L. major</i>	...	A	K	D	Y	P	-	E	C	F	A	A	C	L	Y	A	C	Y	D	L	L	K	...
<i>M. musculus</i>	...	L	Q	E	E	K	R	E	C	F	G	A	C	L	F	T	C	Y	D	L	L	R	...
<i>H. sapiens</i>	...	L	Q	E	E	K	R	E	C	F	G	A	C	L	F	T	C	Y	D	L	L	R	...
		1558																					1578

Figura 5.2 Localização de resíduos de cisteínas no domínio de trimerização da cadeia pesada de clatrina (Adaptado de Ybe et al, 2003).

Assim, nossos resultados de bioinformática apóiam firmemente a presença de genes codificantes para as cadeias leve e pesada de clatrina em *T. cruzi*.

O complexo adaptador AP2 está associado ao tráfego de vesículas revestidas por clatrina a partir da membrana plasmática ao endossomo inicial, e contém duas grandes subunidades (~100 kDa) denominadas AP α e AP β , uma subunidade média (~ 50 kDa, denominada AP μ 2) e uma subunidade pequena (~ 20 kDa, denominada AP σ 2) (Edeling et al., 2006). Nossos resultados na análise genômica mostram que o *T. cruzi* possui o conjunto completo de subunidades do complexo adaptador AP2 necessário para o funcionamento da clatrina no brotamento de vesículas a partir da membrana plasmática.

Nossos dados sobre o complexo adaptador AP2 estão de acordo com os obtidos previamente em *T. cruzi* (Denny et al., 2005) onde foi demonstrado que este parasita possui 4 conjuntos completos de complexos adaptadores (AP1-4). Esses autores também mostraram que *L. major* não possui o complexo AP4 e *T. brucei* não possui o complexo AP2. As razões para tais diferenças em parasitas intimamente relacionados permanecem obscuras, embora tenha sido proposto que a falta do AP2 no sistema endocítico de *T. brucei* possa simplificar a via para assegurar a rápida e não-seletiva endocitose de VSGs (glicoproteínas variáveis de superfície), anticorpos e outros componentes (Allen et al., 2003).

Em contraste, talvez o nível mais elevado de complexidade do ciclo de vida de *T. cruzi* exija conjuntos completos para os quatro complexos AP como um requisito essencial para que este parasita intracelular possa habitar uma gama de tipos de células em seus hospedeiros, uma adaptação que requer a modulação de moléculas na superfície do protozoário e o escape ativo do vacúolo parasitóforo para o citoplasma (Denny et al., 2005). Para apoiar essa hipótese, um estudo em *L. major* mostrou que o tráfego mediado por clatrina/AP1 é essencial para a sobrevivência do parasita dentro de macrófagos (Gokool, 2003). Não há estudos com AP2 em *Leishmania*.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Em nosso trabalho produzimos em camundongo um anticorpo policlonal para a cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* (TcClatrina). A especificidade deste anticorpo

foi analisada por *Western blot*. Este anticorpo reconheceu um polipeptídio de aproximadamente 192 kDa em extratos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, correspondente à TcClatrina endógena. Não foram observadas diferenças na expressão da clatrina entre estas formas, implicando que esta proteína é expressa igualmente nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* analisadas.

Entretanto, quando reagido com extratos totais de *T. brucei* e *L. major* o anticorpo reconheceu um polipeptídio de massa molecular menor do que aquele observado em *T. cruzi* (~192 kDa). Já foi descrito (Allen et al., 2003; Denny et al., 2005) que a cadeia pesada de clatrina de *T. brucei* (Tb927.10.6050) tem massa molecular predita em bancos de dados de 190 kDa, assim como a cadeia pesada de clatrina de *L. major* (LmjF.36.1630). Tal fato explica os resultados obtidos em nossas análises de *Western blot*.

Esse anticorpo também forneceu reação positiva com formas epimastigotas de *Blastocrithidia culicis*, formas coanomastigotas de *Crithidia fasciculata*, formas coanomastigotas de *Crithidia deanei* com bactéria endossimbionte e formas promastigotas de *Phytomonas serpens*, também reconhecendo um polipeptídio com cerca de 192 kDa. Entretanto, seus genomas ainda não foram sequenciados e não há dados na literatura sobre a presença dessa proteína nesses organismos.

O anticorpo para TcClatrina foi produzido para a porção globular da proteína. Os nossos dados de *Western blot* com reação positiva em extratos totais de diferentes tripanosomatídeos mostram que a porção globular da clatrina é conservada entre estes protozoários.

Em nosso trabalho também produzimos em camundongo anticorpos policlonais para a proteína da cadeia leve de clatrina de *T. cruzi*. Entretanto, a análise por *Western blot* mostrou uma reação positiva em extratos totais de *T. cruzi* com um polipeptídio de tamanho de cerca de 60 kDa, sendo que o tamanho predito em bancos de dados é de 26 kDa. A porção N-terminal da cadeia leve tende a ser rica em prolina e glicina, o que pode explicar a anômala motilidade eletroforética dessa proteína, que eleva a massa molecular estimada para 32-36 kDa (Kirchhausen, 2000). Entretanto, nossos resultados de *Western blot* indicaram que a proteína TcCLC apresenta uma massa molecular de aproximadamente 60 kDa, não compatível com aquele indicado na busca em bancos de dados (23 kDa). Uma das

possíveis explicações para esta anômala motilidade eletroforética é que as subunidades da cadeia leve estão dimerizadas *in vitro*.

A análise da expressão da cadeia leve de clatrina (TcCLC) em diferentes tripanosomatídeos por meio de *Western blot* (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia fasciculata*, *Crithidia deanei* com bactéria endossimbionte e *Phytomonas serpens*) indicou que nosso anticorpo reconhece um polipeptídio de massa molecular similar em todos eles, mostrando assim a conservação desta proteína.

Produzimos também anticorpos policlonais em camundongos para a porção N-terminal da subunidade AP β . Os nossos dados mostram que este antisoro reconheceu um polipeptídio de massa molecular esperado em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

5.3 ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO SUB-CELULAR

Na maioria das células eucarióticas a endocitose mediada por receptor envolve em geral a formação de vesículas endocíticas revestidas por clatrina. Estudos anteriores sugeriram que formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de ingerir proteínas através de endocitose mediada por receptor (De Figueiredo e Soares, 2000; Porto-Carreiro et al., 2000; Soares e De Souza, 1991), mas as moléculas envolvidas nas etapas iniciais do processo de endocitose ainda são pouco conhecidas. Vesículas endocíticas sem revestimento foram observadas brotando da membrana da bolsa flagelar (Soares et al., 1992) e do citóstoma/citofaringe de formas epimastigotas (De Figueiredo e Soares, 2000). Esses estudos postularam a hipótese da ausência de vesículas revestidas por clatrina em *T. cruzi*. No entanto, vesículas revestidas foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão próximas ao complexo de Golgi de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (Sant'Anna et al., 2004) sugerindo a síntese e expressão de clatrina por esse parasita. A hipótese de que os revestimentos de clatrina são montados em *T. cruzi* é apoiada por informações de bancos de dados genômicos onde se demonstra a ocorrência de clatrina e de um conjunto completo de quatro β -adaptinas, bem como as outras subunidades necessárias para formar os complexos adaptadores AP1-4 (esta dissertação; Denny et al., 2005). A hipótese da presença da clatrina em *T. cruzi* é reforçada por análises

de bioinformática e moleculares realizadas em outros tripanosomatídeos heteroxênicos, mostrando a presença de clatrina e adaptadores em *L. major* (Denny et al., 2005) e em *T. brucei* (Morgan et al., 2001, 2002).

Um estudo mais recente revelou novos aspectos sobre o processo de endocitose em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Corrêa et al., 2007). Nesse trabalho foi demonstrada a expressão da clatrina, usando para isso anticorpos para clatrina bovina. Além disso, os autores também demonstraram evidências morfológicas por microscopia confocal para a localização da clatrina na região da bolsa flagelar (Corrêa et al., 2007). Entretanto tais dados necessitavam de confirmação, pois foi usada a cadeia pesada da clatrina bovina, que tem baixa identidade (39%) com a clatrina de *T. cruzi*.

Assim, no presente estudo foram produzidos anticorpos para uma região N-terminal (resíduos 2-453) conservada da cadeia pesada da clatrina de *T. cruzi*. Com este antisoro foi possível observar a localização desta proteína na bolsa flagelar de formas epimastigotas e na região compatível com o Complexo de Golgi de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por microscopia confocal. Além disso, foi possível observar reação positiva para cadeia pesada da clatrina difusa pelo citoplasma das células, o que corresponderia às moléculas de clatrina não polimerizadas.

Em formas promastigotas de *L. major* a clatrina (usando um anticorpo para clatrina de *T. brucei*) foi localizada em estruturas vesiculares distribuídas pela célula, e concentradas na porção da bolsa flagelar e Complexo de Golgi, sendo correlacionadas com vesículas revestidas mediando endocitose e exocitose. Também foi verificada a localização da subunidade AP β do complexo AP1 em formas promastigotas de *L. major*, a qual foi encontrada parcialmente co-localizando com o Complexo de Golgi bem como em estruturas distribuídas pela célula, uma localização similar em *T. brucei* (Denny et al., 2005).

A localização da cadeia pesada de clatrina na bolsa flagelar de formas epimastigotas de *T. cruzi* é compatível com estudos de endocitose, pois a forma epimastigota é uma forma de alta atividade endocítica, enquanto que ainda não foi observada a endocitose em formas tripomastigotas (Corrêa et al., 2002). Nossa análise de formas epimastigotas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiu confirmar a localização da cadeia pesada de clatrina associada à membrana da bolsa flagelar. Por outro lado, não foi observada reação positiva

associada à membrana do citóstoma/citofaringe, demonstrando assim que a endocitose mediada por clatrina ocorre exclusivamente na bolsa flagelar. Nossos experimentos com transferrina e albumina mostraram a endocitose dessas proteínas quase que exclusivamente pelo citóstoma/citofaringe sem a formação de vesículas revestidas, como já visto anteriormente por outros autores (De Figueiredo e Soares, 2000; Porto-Carreiro et al., 2000). Em conjunto, esses dados indicam que no citóstoma de *T. cruzi* há endocitose mediada por receptor, mas sem envolvimento de vesículas revestidas por clatrina, enquanto que na bolsa flagelar há endocitose mediada por clatrina. Entretanto ainda não sabemos quais proteínas são ingeridas preferencialmente pela bolsa flagelar.

Os poucos trabalhos sobre endocitose em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (formas não-replicativas) falharam em demonstrar a ingestão de proteínas marcadas com ouro coloidal (Corrêa et al., 2002; Soares e De Souza, 1991). A única evidência morfológica de presença de clatrina foi aparentemente associada com vesículas revestidas brotando a partir do Complexo de Golgi (Sant'Anna et al., 2004). As hipóteses geradas foram ou que formas tripomastigotas de *T. cruzi* ingerem nutrientes através de um processo muito rápido de endocitose na membrana da bolsa flagelar, o que é difícil de observar, ou estes parasitas usam um mecanismo alternativo de obtenção de energia, como o transporte através da membrana plasmática (Corrêa et al., 2007). Assim, em formas tripomastigotas a clatrina estaria mais envolvida no tráfego exocítico a partir do Complexo de Golgi.

Em formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* os nossos resultados não foram conclusivos, talvez devido a uma reação cruzada do anticorpo anti-TcClatrina com epítomos da célula hospedeira, gerando marcação difusa no citoplasma tanto de *T. cruzi* quanto na célula hospedeira, impedindo assim a aquisição de imagens claras da TcClatrina nas formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Em relação aos amastigotas extracelulares de *T. cruzi* observamos uma reação não específica no citoplasma das células, possivelmente por não termos um protocolo definido para produção de amastigotas no laboratório, levando à obtenção de amastigotas mal preservadas e conseqüentemente uma reação inespecífica. Mas pretendemos no futuro reanalisar o protocolo para melhorar a preservação das formas obtidas.

Nos outros tripanosomatídeos estudados (*C. deanei*, *C. fasciculata* e *P. serpens*) a marcação da cadeia pesada de clatrina se apresenta também na região da bolsa flagelar, o que demonstra que esta proteína é bem conservada entre diferentes tripanosomatídeos e que a endocitose nestes parasitas parece ocorrer na bolsa flagelar mediada por clatrina. Ainda não existem dados publicados sobre estes parasitas com relação ao tipo de endocitose que ocorre.

Em *T. brucei* a depleção da cadeia pesada de clatrina por meio de RNA de interferência causa um severo fenótipo, levando à rápida letalidade dos parasitas (Allen et al., 2003). Esta depleção gera um fenótipo que os autores chamaram de “BigEye” que é causado pelo alargamento expressivo da bolsa flagelar destes parasitas em decorrência do bloqueio da endocitose, mas não da exocitose. Em nosso trabalho procuramos reproduzir este fenótipo em *T. cruzi* utilizando metagênese condicionada (Dominante Negativo). Entretanto não obtivemos resultados positivos, provavelmente devido ao fato de que há muito mais proteína nativa do que a proteína mutada, não sendo assim possível a geração de um fenótipo alterado relevante.

A cadeia leve de clatrina não é tão conservada entre os organismos, o que dificulta a identificação do gene no genoma de *T. cruzi*. Apesar dos dados de *Western blot* mostrarem uma proteína com massa molecular não compatível com bancos de dados, procedemos à imunolocalização por microscopia confocal desta proteína, que apresentou localização na bolsa flagelar de formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e no que parece ser o Complexo de Golgi de formas tripomastigotas. Também conseguimos detectar a cadeia leve de clatrina em diferentes tripanosomatídeos (*C. deanei*, *C. fasciculata*, *B. culicis* e *P. serpens*) no local em que parece ser o Complexo de Golgi destes parasitas. Por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível localizar esta proteína associada à membrana da bolsa flagelar de formas epimastigotas de *T. cruzi*, o que indica uma associação com a cadeia pesada da clatrina, como esperado.

Ao proceder a imunolocalização por microscopia confocal da subunidade Ap β do complexo adaptador, observamos uma localização não esperada, no núcleo de formas epimastigotas de *T. cruzi* e no que parece ser a região da bolsa flagelar de formas procíclicas de *T. brucei*. Esse procedimento deverá ser repetido em breve para confirmação dos dados.

Em conclusão, nossos dados demonstram a existência e expressão de clatrina (cadeia leve e pesada) e da subunidade AP β do complexo adaptador AP2 em *T. cruzi* e em outros tripanosomatídeos. Nossos dados morfológicos indicam a associação das cadeias pesada e leve da clatrina na região da bolsa flagelar. Entretanto, não foi possível realizar estudos de co-localização destas diferentes proteínas, pois todos os antisoros foram obtidos em camundongos. Mas dados de imunoprecipitação indicam que a cadeia leve de clatrina e a subunidade do complexo adaptador AP β interagem com a cadeia pesada de clatrina.

6. CONCLUSÕES

1. A sequência nucleotídica da cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* (Tc00.1047053506167.50) indica a expressão de uma proteína bastante similar à clatrina humana (identidade = 40%; similaridade = 62%), contendo todos os domínios necessários para o seu funcionamento.
2. Busca de homologia entre seqüências de aminoácidos de diversos organismos permitiu identificar o gene (Tc00.1047053506211.240) que codifica uma provável cadeia leve de clatrina.
3. Análise genômica mostrou que o *T. cruzi* possui o conjunto completo de subunidades do complexo adaptador AP2.
4. Um anticorpo policlonal para a cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* (TcClatrina) reconheceu um polipeptídio de aproximadamente 192 kDa em extratos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, correspondente à TcClatrina endógena. Não foram observadas diferenças na expressão da clatrina entre estas formas, implicando que esta proteína é expressa igualmente.
5. O anticorpo para TcClatrina forneceu reação positiva com formas epimastigotas de *Blastocrithidia culicis*, coanomastigotas de *Crithidia fasciculata*, coanomastigotas de *Crithidia deanei* com bactéria endossimbionte e promastigotas de *Phytomonas serpens*, também reconhecendo um polipeptídio com cerca de 192 kDa. Isso nos mostra que a porção globular da cadeia pesada da clatrina é conservada entre estes protozoários.
6. Produzimos em camundongo anticorpos policlonais para a proteína da cadeia leve de clatrina de *T. cruzi*. A análise da expressão desta proteína (TcCLC) em diferentes tripanosomatídeos por meio de *Western blot* (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia fasciculata*, *Crithidia deanei* com bactéria endossimbionte e *Phytomonas serpens*) indicou que o anticorpo reconhece um polipeptídio de massa molecular (60 kDa) similar em todos eles.
7. Antisero para TcClatrina localizou esta proteína na bolsa flagelar de formas epimastigotas e na região compatível com o Complexo de Golgi de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por microscopia confocal. Além disso, houve

reação positiva difusa pelo citoplasma das células, o que corresponderia às moléculas de clatrina não polimerizadas.

8. Nossos dados indicam que no citóstoma de *T. cruzi* há endocitose mediada por receptor mas sem envolvimento de vesículas revestidas por clatrina, enquanto que na bolsa flagelar há endocitose mediada por clatrina.
9. Nos outros tripanosomatídeos estudados (*C. deanei*, *C. fasciculata* e *P. serpens*) a marcação da cadeia pesada de clatrina se apresenta na região da bolsa flagelar, o que demonstra que esta proteína é bem conservada entre diferentes tripanosomatídeos e que a endocitose nestes parasitas parece ocorrer na bolsa flagelar mediada por clatrina.
10. Procuramos reproduzir o fenótipo “BigEye” em *T. cruzi* utilizando mutagênese condicionada (Dominante Negativo). Entretanto não obtivemos resultados positivos, provavelmente devido ao fato de que há muito mais proteína nativa do que a proteína mutada.
11. Localizamos a cadeia leve de clatrina em diferentes tripanosomatídeos (*C. deanei*, *C. fasciculata*, *B. culicis* e *P. serpens*) no sítio em que parece ser o Complexo de Golgi destes parasitas. Por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível localizar esta proteína associada à membrana da bolsa flagelar de formas epimastigotas de *T. cruzi*, o que indica uma associação com a cadeia pesada da clatrina, como esperado.
12. Dados de imunoprecipitação indicam que a cadeia leve de clatrina e a subunidade do complexo adaptador AP β interagem com a cadeia pesada de clatrina.

REFERÊNCIAS

ALLEN CL, GOULDING D, FIELD MC. **Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei***. EMBO J 22: 4991-5002, 2003.

BLONDEAU F, RITTER B, ALLAIRE PD, WASIAK S, GIRARD M, HUSSAIN NK. **Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling**. Proc Natl Acad Sci USA 101: 3833–3838, 2004.

BONALDO MC, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W, GOLDENBERG S. **Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation**. J Cell Biol 106: 1349-1358, 1988.

BONIFACINO JS, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. **Coat proteins: shaping membrane transport**. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 409-414, 2003.

BRICKMAN MJ, COOK JM, BALBER AE. **Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment in African trypanosomes**. J Cell Sci 108: 3611-3621, 1995.

BRODSKY FM. **Analysis of coated vesicle structure and function using anti-clathrin monoclonal antibodies**. Prog Clin Biol Res. 270: 141-52, 1988.

BRODSKY FM, CHEN CY, KNUEHL C, TOWLER MC, WAKEHAM DE. **Biological basketweaving: Formation and Function of Clathrin-Coated Vesicles**. Annu Rev Cell Dev Biol 17: 517–68, 2001.

CAMARGO EP. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media**. Rev Inst Med Trop 12: 93-100, 1964.

CHAGAS C. **Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159-218, 1909.

CONNER SD; SCHMID SL. **Regulated portals of entry into the cell.** Nature 422:37-44, 2003.

CONTRERAS VT, SALLES JM, THOMAS N, MOREL CM, GOLDENBERG S. ***In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol Biochem Parasitol 16: 315-327, 1985.

CONTRERAS VT, ARAUJO-JORGE TC, BONALDO MC, THOMAZ N, BARBOSA HS, MEIRELLES MN, GOLDENBERG S. **Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 123-133, 1988.

CORRÊA AF, ANDRADE LR, SOARES MJ. **Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms.** Parasitol Res 88:875–880, 2002.

CORRÊA JR. ***Trypanosoma cruzi*: Contribuição ao estudo da endocitose dependente e independente de clatrina em formas epimastigotas.** Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC-FIOCRUZ, RJ, 2007.

CORRÊA JR, ATELLA GC, MENNA-BARRETO RS, SOARES MJ. **Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites.** J Euk Microbiol 54:297-302, 2007.

CORRÊA JR, ATELLA GC, BATISTA MM, SOARES MJ. **Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytostome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis.** Exp Parasitol 119:58-66, 2008.

DE FIGUEIREDO RC, SOARES MJ. **Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** Parasitol Res 86: 413-418, 2000.

DE SOUZA W, SANT'ANNA C, CUNHA-E-SILVA NL. **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa.** Progress Histochem Cytochem 44: 67-124, 2009.

DE SOUZA W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Curr Pharm Des 8: 269-285, 2002.

DELL'ANGELICA EC, OHNO H, OOI CE, RABINOVICH E, ROCHE KW, BONIFACINO JS. **AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression.** EMBO J 16: 917-928, 1997.

DENNY PW, MORGAN GW, FIELD MC, SMITH DF. ***Leishmania major*: Clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite.** Exp Parasitol 109: 33-37, 2005.

DO CAMPO R, MORENO SNJ. **Acidocalcisome: A novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites.** Parasitol Today 15: 443-448, 1999.

EDELING MA, SMITH C, OWEN D. **Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures.** Nat Rev Mol Cell Biol 7: 32-44, 2006.

EGELMAN EH, ORLOVA A. **Allostery, cooperativity, and different structural states in F-actin.** J Struct Biol 115: 159-62, 1995.

FOTIN A, CHENG Y, SLIZ P, GRIGORIEFF N, HARRISON SC, KIRCHHAUSEN T, WALZ T. **Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy.** Nature 432: 573-579, 2004.

GOKOOL S. **Sigma 1- and mu 1-Adaptin homologues of *Leishmania mexicana* are required for parasite survival in the infected host.** J Biol Chem 278: 29400-29409, 2003.

GOLDSTEIN JL, ANDERSON RG, BROWN MS. **Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis.** Nature 279: 679-685, 1979

ITOW-JANKEVICIUS S, ALMEIDA ML, JANKEVICIUS JV, CAVAZZANA MJR., ATTIAS M, DE SOUZA W. **Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* - Coreidae) and their experimental transmission.** J Euk Microbiol 40: 576-581, 1993.

KANASEKI T, KADOTA K. **The “vesicle in a basket”. A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements.** J Cell Biol 42: 202-220, 1969.

KIRCHHAUSEN T, HARRISON SC. **Structural domains of clathrin heavy chains.** J Cell Biol 99: 1725–1734, 1984.

KIRCHHAUSEN T. **Clathrin.** Annu Rev Biochem 69: 699-727, 2000.

LAEMMLI, UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227: 680–685, 1970.

LANDY A. **Dinamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination.** Annu Rev Biochem 58: 913-949, 1989.

LIU SH, WONG ML, CRAIK CS, BRODSKY FM. **Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs.** Cell 83: 257–267, 1995.

MAYOR S, PAGANO RE. **Pathways of clathrin-independent endocytosis.** Nat Rev Mol Cell Biol 8: 603-609, 2007

MAXFIELD FR, MCGRAW TE. **Endocytic Recycling.** Nat Rev Mol Cell Biol 5: 121 – 132, 2004.

MILDER R, DEANE MP. **The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*.** J Protozool 16: 730-737, 1969.

MORGAN GW, ALLEN CL, JEFFRIES TR, HOLLINSHEAD M, AND FIELD MC. **Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*.** J Cell Sci, 114: 2605–2615, 2001.

MORGAN GW, HALL BS, DENNY PW, CARRINGTON M, MARK C. FIELD. **The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences.** Trends Parasitol 18: 491-496, 2002.

OPPERDOES FR, MICHELS PAM. **The evolutionary origin of glycosomes.** Parasitol Today 7:150-109, 1991.

PEARSE BM. **Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles.** Proc Natl Acad Sci USA 73: 1255–1259, 1976.

PEARSE BM, CROWTHER RA. **Structure and assembly of coated vesicles.** Annu Rev Biochem Biophys Com 16: 49-68, 1987.

PORTO-CARREIRO I, ATTIAS M, MIRANDA K, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA N. ***Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** Eur J Cell Biol 79: 858-869, 2000.

ROTH M. **Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins.** Nat Rev Mol Cell Biol 7: 63-68, 2006.

- ROYLE SJ, BRIGHT NA, LAGNADO L. **Clathrin is required for the function of the mitotic spindle.** Nature 434:1152-1157, 2005.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** N.Y: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANT'ANNA C, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA N. **Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*.** Microsc Microanal 10: 637-646, 2004.
- Schmunis GA, Cruz JR. **Safety of the blood supply in Latin America.** Clin Microbiol Rev 18: 12–29, 2005.
- SIMPSON F, PEDEN AA, CHRISTOPOULOU L, ROBINSON MS. **Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3.** J Cell Biol 137: 835-845, 1997.
- SOARES MJ, DE SOUZA W. **Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*.** Parasitol Res 77: 461-468, 1991.
- SOARES MJ, SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W. **Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*.** J Cell Sci 102: 157–167, 1992.
- TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354, 1979.
- TYLER KM, ENGMAN DM. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** Internat J Parasit 31: 472-481, 2001.
- YBE JA, BRODSKY FM, HOFMANN K, LIN K, LIU SH, CHEN L. **Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix.** Nature 399: 371–375, 1999

YBE JA, RUPPEL N, MISHRA S, VANHAAFTEN E. **Contribution of cysteines to clathrin trimerization domain stability and mapping of light chain binding.** Traffic 4: 850–856, 2003.

YOUNG A. **Structural insights into the clathrin coat.** Semin Cell Dev Biol 18: 448-458, 2007.

VATARUNAKAMURA C, UEDA-NAKAMURA T, DE SOUZA W. **Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging.** FEMS Microbiol Lett 242: 227-230, 2005.

WHO. **Control of Chagas disease.** WHO Tech Series vol. 811, Geneva, 1991. p. 1–95.

WU C. **Heat shock transcription factors: structure and regulation.** Annu Rev Cell Dev Biol 11: 441-469, 1995.